

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie  
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Analyse organoprotektiver Effekte der  
renalen Denervation zur Behandlung  
therapierefraktärer arterieller Hypertonie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Martina Rita Monika Bonss**

aus

Nürnberg

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: PD Dr. med. M. Wallbach

Ko-Referent: Prof. Dr. med. M. R. Schroeter

Drittreferent: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 30.04.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Analyse organoprotektiver Effekte der renalen Denervation zur Behandlung therapierefraktärer arterieller Hypertonie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis:</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis:</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis:</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Definition Arterieller Hypertonie .....	1
1.2 Pharmakologische Therapie .....	2
1.3 Therapieresistente Hypertonie .....	2
1.4 Endorganschäden .....	3
1.4.1 Vaskulopathie .....	4
1.4.1.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) .....	4
1.4.1.1.1 Quantität der EPCs.....	4
1.4.1.1.2 Proliferationsfähigkeit der EPCs.....	5
1.4.1.1.3 Funktionalität der EPCs .....	5
1.4.2 Hypertensive Nephropathie.....	6
1.4.3 Proteinurie .....	7
1.5 Rolle des sympathischen Nervensystems in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie.....	8
1.6 Interventionelle Therapieoptionen .....	9
1.6.1 Barorezeptorenstimulation (BAT).....	9
1.6.2 Renale Denervation (RD).....	10
1.6.3 Weitere interventionelle Therapieverfahren.....	12
1.7 Fragestellung .....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Material .....	14
2.1.1 Antikörper .....	14
2.1.2 Biologisches Material.....	15
2.1.3 Lösungen, Medien, Chemikalien .....	16
2.1.4 Gebrauchswaren .....	17
2.1.5 Geräte und Software.....	18
2.2 Formale Kriterien .....	20
2.2.1 Studiendesign .....	20
2.2.2 Ethik .....	20

2.2.3	Patienten .....	21
2.2.4	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie .....	22
2.2.5	Studienverlauf und Studienendpunkte .....	23
2.2.6	Renale Denervation .....	25
2.3	Klinische Methoden .....	25
2.3.1	Eigenanamnese .....	25
2.3.2	Körperliche Untersuchung .....	26
2.3.3	Technische Untersuchungen .....	26
2.3.3.1	Langzeit-Blutdruckmessung .....	26
2.3.3.2	Nierenarteriendopplersonographie.....	26
2.3.3.3	Laborparameter .....	27
2.3.3.3.1	Berechnete glomeruläre Filtrationsrate - Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) .....	27
2.3.3.3.2	Protein im Urin .....	27
2.3.3.3.3	Laborchemische Beurteilung der Nierenfunktion.....	28
2.3.3.3.4	Aldosteron-Renin-Quotient.....	28
2.4	Experimentelle Methoden .....	28
2.4.1	Isolation von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells).....	28
2.4.2	Durchflusszytometrie .....	29
2.4.2.1	Durchflusszytometrische Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen (EPCs).....	29
2.4.2.2	Antikörperfärbungen .....	31
2.4.2.3	FACS-Analyse .....	32
2.4.3	Zellkultur von Colony Forming Units (CFU) endothelialer Progenitorzellen (EPCs) .....	33
2.4.4	Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse .....	33
2.4.4.1	Laserscanning-Zytometrie (iCYS).....	33
2.4.4.2	Immunologische Identifizierung.....	35
2.4.4.3	Software-Analyse.....	36
2.5	Statistische Auswertung.....	37
2.5.1	Statistische Analysen.....	37
2.5.2	Graphische Darstellung der Ergebnisse .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Auswertung der Patientendaten .....	38
3.2	Auswertung der Blutdruckmessungen vor und nach renaler Denervation .....	40

3.2.1	Einzelmessungen .....	40
3.2.2	24-Stunden-Blutdruckmessung .....	41
3.3	Auswertung von Laborparametern vor und nach renaler Denervation.....	43
3.3.1	Beurteilung der Nierenfunktion .....	43
3.3.2	Laborchemische Marker einer Proteinurie .....	45
3.4	Auswertung der Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	47
3.5	Auswertung der Proliferationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen (EPCs) über Quantifizierung von Colony Forming Units (CFUs) in Zellkultur .....	49
3.6	Auswertung der mittels Laserscanning-Zytometrie (iCys) bestimmten eNOS-Expression endothelialer Progenitorzellen (EPCs).....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Renale Denervation nach der SYMPPLICITY HTN-3-Studie.....	53
4.1.1	Wissenschaftliche Diskussionen und Betrachtungen .....	53
4.1.1.1	Überblick über die SYMPPLICITY HTN-Studien.....	53
4.1.1.2	Weiterer Studienhintergrund zur renalen Denervation .....	56
4.1.1.3	Kritik am Design früherer Studien.....	57
4.1.1.4	Kritik an der SYMPPLICITY HTN-3-Studie .....	58
4.1.1.4.1	Konsistenz im medikamentösen Therapieregime, Monitoring und Besonderheiten von Subgruppen .....	58
4.1.1.4.2	Durchführung der renalen Denervation .....	60
4.1.2	Auswirkungen der Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie auf die vorliegende Studie.....	61
4.2	Interpretation und Einordnung der Ergebnisse .....	62
4.2.1	Entwicklung des arteriellen Blutdrucks .....	62
4.2.2	Renoprotektive Effekte .....	63
4.2.3	Vaskuloprotektive Effekte.....	67
4.3	Limitationen der Studie.....	69
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Abgrenzung der vorliegenden Dissertation mit Präsentation der nephrologischen Endpunkte von der Dissertation Schulze-Brock mit kardiologischen Endpunkten.....</b>	<b>72</b>
6.1	Gemeinsam erhobene Parameter.....	72
6.2	Nephrologische Parameter .....	72
6.3	Kardiologische Parameter .....	73
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>

## Abbildungsverzeichnis:

<b>Abbildung 1:</b> Endorganschäden.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Charakteristische Auftrennung ungefärbter Zellen in der Durchflusszytometrie.....	30
<b>Abbildung 3:</b> Modell eines iCYS Laserscanning Zytometers .....	35
<b>Abbildung 4:</b> Box-Whiskers-Plot der Anzahl antihypertensiver Medikamente vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	40
<b>Abbildung 5:</b> Box-Whiskers-Plot der Veränderung der berechneten glomerulären Filtrationsrate vor und sechs Monate nach renaler Denervation.....	44
<b>Abbildung 6:</b> Box-Whiskers-Plot der Quantität endothelialer Progenitorzellen (CD133/Flk-1 doppelt positiv) vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	47
<b>Abbildung 7:</b> Box-Whiskers-Plot der Quantität endothelialer Progenitorzellen (CD133/cKit doppelt positiv) vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	48
<b>Abbildung 8:</b> Zellkolonien EPCs (I) .....	50
<b>Abbildung 9:</b> Zellkolonien EPCs (II) .....	50
<b>Abbildung 10:</b> Balkendiagramm nach Gruppen entsprechend der Anzahl von Kolonien EPCs in der Zellkultur vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	51

## Tabellenverzeichnis:

<b>Tabelle 1:</b> Studienverlauf und erhobene Studienparameter .....	23
<b>Tabelle 2:</b> Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen und deren Charakteristika in der Durchflusszytometrie .....	31
<b>Tabelle 3:</b> Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen und deren Charakteristika in der Laserscanning-Zytometrie.....	36
<b>Tabelle 4:</b> Stichprobengröße und Geschlechterverteilung .....	38
<b>Tabelle 5:</b> Demographische Daten des untersuchten Patientenkollektivs .....	38
<b>Tabelle 6:</b> Anzahl und Typ antihypertensiver Medikation vor und sechs Monate nach renaler Denervation.....	39
<b>Tabelle 7:</b> Mittelwerte des arteriellen Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	41
<b>Tabelle 8:</b> Auswertung der Langzeitblutdruckaufzeichnungen über 24 Stunden vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	42
<b>Tabelle 9:</b> Laborchemische Beurteilung der Nierenfunktion vor und sechs Monate nach renaler Denervation.....	44
<b>Tabelle 10:</b> Laborchemische Beurteilung einer Proteinurie vor und sechs Monate nach renaler Denervation.....	45
<b>Tabelle 11:</b> Auswertung der Quantität der in der Durchflusszytometrie detektierten endothelialen Progenitorzellen.....	49
<b>Tabelle 12:</b> Auswertung der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase endothelialer Progenitorzellen vor und sechs Monate nach renaler Denervation .....	52
<b>Tabelle 13:</b> Überblick über die SYMPPLICITY HTN-Studien .....	54

## Abkürzungsverzeichnis:

ACE-Hemmer	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	alkalische Phosphatase
BAT	Barorezeptorenstimulation
BMI	<i>body mass index</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD 133	<i>cluster of differentiation 133</i>
CFUs	<i>colony forming units</i>
CK	Kreatinkinase
c-Kit	Tyrosinkinase Kit
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
eGFR	berechnete glomeruläre Filtrationsrate
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPCs	endotheliale Progenitorzellen
ESH	European Society of Hypertension
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
Flk-1	<i>fetal liver kinase - 1</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HTN	Hypertonie
iCYS	Laserscanning-Zytometrie
Ig G	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
LZ-EKG	Langzeit-EKG (24h)
LZ-RR	Langzeit-Blutdruckuntersuchung (24h)
MAD	mittlerer arterieller Druck



## VI

MDRD-Formel	<i>modification of diet in renal disease</i> -Formel
NO	Stickstoffmonoxid
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE-Antikörper	Phycoerythrin-Antikörper
pTT	partielle Thromboplastinzeit
RD	renale Denervation
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
WHO	World Health Organization

## 1. Einleitung

Die arterielle Hypertonie gehört zu den Hauptrisikofaktoren von Herz-Kreislaufkrankungen sowie der kardiovaskulären Mortalität. Weltweit sind laut den Zahlen der WHO von 2013 eine Milliarde Menschen betroffen (WHO 2013). In Deutschland meldet das Robert Koch-Institut eine Prävalenz von über 30 % bei über 45-Jährigen, während in der Altersgruppe über 65 Jahren bereits über die Hälfte der Männer und Frauen betroffen sind mit deutlichem Anstieg mit fortschreitendem Lebensalter (RKI 2012). Steigende Blutdruckwerte stehen in nahezu linearem Zusammenhang mit einem Anstieg des kardiovaskulären Risikos. Jeder Anstieg um 20 mmHg systolisch bzw. 10 mmHg diastolisch über die Zielblutdruckwerte hinaus verdoppelt das Risiko, an einem Herzinfarkt oder Schlaganfall zu versterben (Chobanian et al. 2003).

### 1.1 Definition Arterieller Hypertonie

Die WHO wie auch die deutsche und europäische Leitlinie definieren die arterielle Hypertonie als Blutdruck von systolisch gleich oder höher 140 mmHg, bei gleichzeitig oder isoliert erhöhtem diastolischen Wert von größer oder gleich 90 mmHg.

Unterschieden werden Hypertonie-Grade 1-3:

Hypertonie Grad 1: systolischer Blutdruck 140-159 mmHg oder  
diastolischer Blutdruck 90-99 mmHg

Hypertonie Grad 2: systolischer Blutdruck 160-179 mmHg oder  
diastolischer Blutdruck 100-109 mmHg

Hypertonie Grad 3: systolischer Blutdruck  $\geq 180$  mmHg oder  
diastolischer Blutdruck  $\geq 110$  mmHg

Entsprechend dem vorliegenden Hypertoniegrad und dem kardiovaskulären Gesamtrisiko eines Patienten wird eine Behandlung in Form von Lebensstiländerungen

sowie eine medikamentöse Therapie mit dem Ziel einer Senkung des arteriellen Blutdrucks auf Werte kleiner 140/90 mmHg empfohlen. Bei Diabetikern sollte ein diastolischer Blutdruck zwischen 80 mmHg und 85 mmHg angestrebt werden (Mancia et al. 2013).

## **1.2 Pharmakologische Therapie**

Zur pharmakologischen Therapie der arteriellen Hypertonie sind die fünf Substanzklassen der ACE-Hemmer, Angiotensinrezeptorblocker, Diuretika, Betablocker und Calciumantagonisten in gleicher Weise für eine Initial- und Dauerbehandlung geeignet (Mancia et al. 2013). Eine Behandlung ist unter Berücksichtigung der absoluten oder relativen Kontraindikationen jeweils in Mono- oder Kombinationstherapie möglich. Die Auswahl sollte entsprechend patienteneigenen spezifischen Indikationen erfolgen (Mancia et al. 2013).

## **1.3 Therapieresistente Hypertonie**

Die therapieresistente Hypertonie ist definiert als nicht leitliniengerecht eingestellter arterieller Blutdruck trotz einer adäquaten Behandlung mit drei oder mehr Antihypertensiva oder entsprechend bei Behandlung mit vier oder mehr blutdrucksenkenden Medikamenten unabhängig davon, ob die Blutdruckwerte im Zielbereich liegen oder nicht. Unter den Antihypertensiva sollte mindestens ein Diuretikum sein (Fagard 2012).

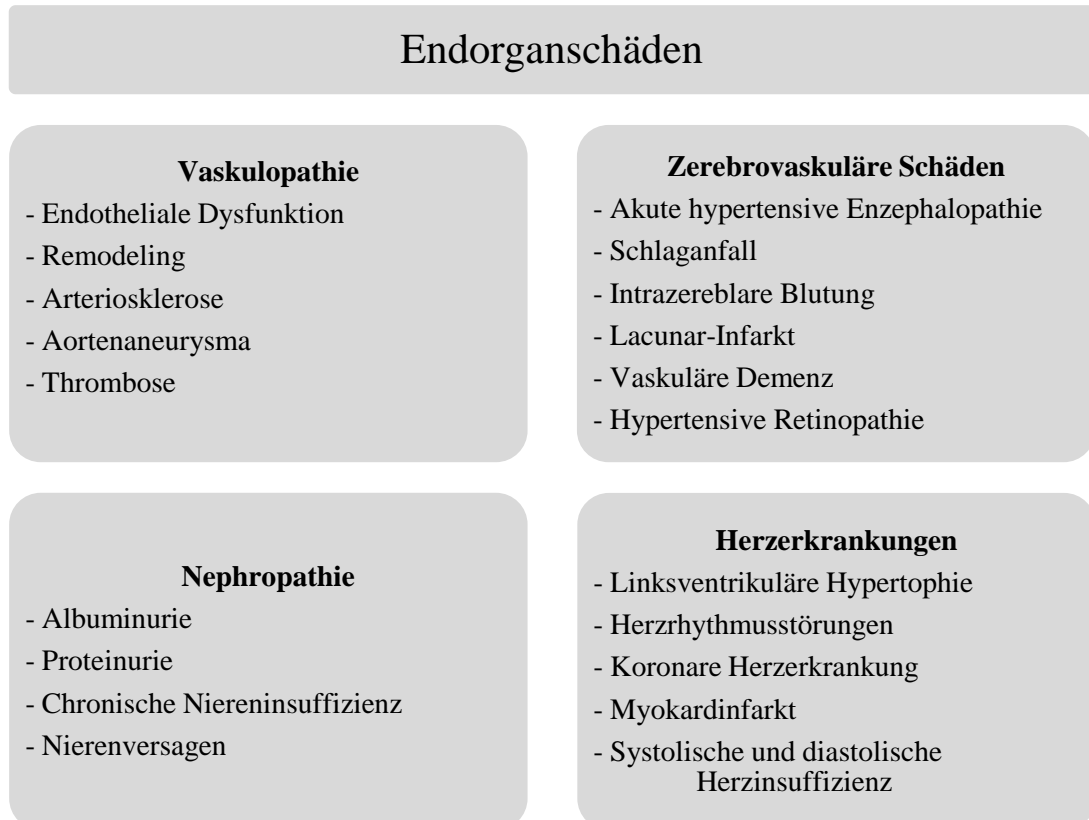
Betrachtet man die hohe Prävalenz der arteriellen Hypertonie, so ist von Therapieresistenz ein durchaus beträchtlicher Anteil von Menschen betroffen. Große Studien beschrieben eine Prävalenz unter Patienten mit bekanntem Bluthochdruck von etwa 10-30 % (vgl. Persell 2011, de la Sierra et al. 2011). Diese Zahl mag jedoch je nach Patientenkollektiv variieren. Prävalenzstudienresultate reichen von Angaben unter 5 % (vgl. Weitzman et al. 2014) bis hin zu möglicherweise deutlich vermehrtem Vorkommen in spezialisierten Zentren, was darin mitbegründet liegen mag, dass bei

Patienten mit ausgeprägter arterieller Hypertonie häufiger eine Therapieresistenz beobachtet wird (Alper Jr. und Calhoun 1999).

## 1.4 Endorganschäden

Das Patientenkollektiv der therapierefraktären Hypertoniker ist durch den chronisch erhöhten Blutdruck in besonderer Weise durch Endorganschäden gefährdet. Patienten mit therapierefraktärer Hypertonie weisen häufiger und schwerere Endorganschäden im Vergleich zu Patienten mit kontrollierter Hypertonie auf (Cuspidi et al. 2001). Unabhängig von der Ausprägung der Hypertonie kommen relevante Cofaktoren zum Tragen, welche die Schwere der Endorganschäden mit bedingen. Als solche gelten zum Beispiel Störungen im Renin-Aldosteron-System, Übergewicht sowie erhöhter Salzkonsum (Schmieder 2010).

Als Endorganschäden der arteriellen Hypertonie werden im Allgemeinen folgende angesehen:



**Abbildung 1:** Endorganschäden; Abbildung in Anlehnung an Schmieder (2010)

### 1.4.1 Vaskulopathie

Chronisch erhöhter arterieller Blutdruck führt zu Schäden im Gefäßsystem. Diese manifestieren sich in Form endothelialer Dysfunktion sowie Umbauprozessen der kleinen und großen Arterien, wodurch die Vasodilatationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur beeinträchtigt wird. Die Entstehung von Plaques, Stenosen und Aneurysmen wird begünstigt (Schmieder 2010). Klinisch manifest werden diese Veränderungen in Form von Angina pectoris, koronarer Herzkrankheit sowie weiter steigenden Blutdruckwerten aufgrund der sinkenden Volumen- und Anpassungskapazitäten im Gefäßsystem. Auch sämtliche oben gelistete Endorganschäden werden in ihrem Prozess begünstigt. Entscheidend ist deshalb, die Entstehung von Endorganschäden in einem möglichst frühen Stadium zu erkennen, um entsprechend frühzeitig im Sinne einer Sekundärprophylaxe intervenieren zu können. Es ist jedoch unklar, ob eine Absenkung des arteriellen Blutdrucks endogene Reparaturprozesse der Gefäßendothelien verbessert.

#### 1.4.1.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)

##### 1.4.1.1.1 Quantität der EPCs

Endotheliale Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells* - EPCs) bilden eine im Blut zirkulierende Zellpopulation, welche mit der vaskulären Homöostase sowie der endogenen Fähigkeit zur Reparatur vaskulärer Endothelschäden in Verbindung gebracht werden (Asahara et al. 1999). Eine Reihe von Zusammenhängen zwischen der Anzahl zirkulierender EPCs sowie klinischen Parametern konnte gezeigt werden. Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Alter und positiver Familienanamnese für die koronare Herzkrankheit zeigen verminderte Zahlen von EPCs (Werner et al. 2005). Darüber hinaus fand die Arbeitsgruppe um De Groot et al. bei Patienten mit Hyperurikämie im Rahmen fortgeschrittener Niereninsuffizienz eine verringerte Anzahl EPCs (De Groot et al. 2004), ebenso wie die Gruppe um Patschan et al. bei Patienten mit therapierefraktärer Hyperlipidämie (Patschan et al. 2009). Prognostisch werden niedrige Zahlen EPCs relationiert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Fortschreitens atherosklerotischer Prozesse (Schmidt-Lucke 2005) sowie einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse (Perticone et al. 2001). Eine erhöhte

Anzahl zirkulierender EPCs konnte bei akutem Myokardinfarkt (Shintani et al. 2001), akuter Ischämie (Takahashi et al. 1999), sowie Therapie mit Statinen (Llevadot et al. 2001) nachgewiesen werden.

#### 1.4.1.1.2 Proliferationsfähigkeit der EPCs

Die Proliferationsfähigkeit der EPCs konnte in verschiedenen Studien in signifikantem Zusammenhang mit dem kardiovaskulären Risiko, entsprechend dem klinisch bestimmten Framingham Risiko, gebracht werden (Perticone et al. 2001, Hill et al. 2003). Ebenso zeigte die Arbeitsgruppe um Hill et al. eine negative Korrelation zwischen dem Gefäßstatus und der Fähigkeit der EPCs, Kolonien, sogenannte *colony forming units* (CFUs), zu bilden (Hill et al. 2003). In verschiedenen Arbeiten konnten bereits Zusammenhänge zwischen der Bildung von CFUs, und vaskulären Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit (Vasa et al. 2001), Diabetes Mellitus Typ II (Tepper et al. 2002) sowie Hypercholesterinämie und Hypertonie (Hill et al. 2003), dargestellt werden.

#### 1.4.1.1.3 Funktionalität der EPCs

Neben der Quantität sowie der Proliferationsfähigkeit ist die Funktionsfähigkeit der EPCs entscheidend. Die Bestimmung der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) auf der Oberfläche der EPCs ermöglicht es Rückschlüsse auf ihre Funktionalität und ihren Beitrag zur Gefäßhomöostase zu ziehen. Das Enzym, das hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird, katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin mit Hilfe verschiedener Kofaktoren und Sauerstoff. NO trägt auf verschiedene Weise dem Erhalt der vaskulären Homöostase, und einer normalen Endothelfunktion bei. Durch seine vasodilatatorische Wirkung an den glatten Muskelzellen ist es maßgeblich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (Tousoulis et al. 2012). Aber auch der endotheliale Zellverband selbst wird durch NO vor freien Sauerstoffradikalen geschützt (Cai und Harrison 2000). Bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurde eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer verminderten Freisetzung von NO sowohl in der basalen Rate als auch nach Stimulation mit Acetylcholin beschrieben (Panza et al. 1993, Taddei et al. 1998). Eine verringerte Bioverfügbarkeit von NO wiederum führt zu einer verminderten Mobilisation EPCs, wodurch die Fähigkeit zur Reparatur von

Gefäßschäden herabgesetzt ist (Aicher et al. 2003). Die Funktion der EPCs selbst steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Expression von eNOS. So wurde gezeigt, dass bei einer hohen eNOS-Expression apoptotische Zellvorgänge gehemmt, Proliferation und Differenzierung hingegen gefördert werden (Gao et al. 2014, Lemarié et al. 2011).

#### **1.4.2 Hypertensive Nephropathie**

Eine hypertensive Nephropathie ist eine häufige Folge der mit der arteriellen Hypertonie einhergehenden Vaskulopathie. Mit längerer Krankheitsdauer, etwa nach zehn bis fünfzehn Jahren, steigt das Risiko der Nierenschädigung - selbst bei nur moderat erhöhten Blutdruckwerten - deutlich an (Marín et al. 2005). Je höher das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten ist, desto ausgeprägter erscheint eine chronische Nierenschädigung. Bis zu 35 % der Hypertoniker mit zusätzlich hohen kardiovaskulären Risikofaktoren weisen eine berechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) kleiner 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> auf (Ruilope und Bakris 2011). Es handelt sich um einen Prozess, der von Betroffenen meist unbemerkt vonstattengeht. Eine große Studie konnte zeigen, dass eine langjährige arterielle Hypertonie nach dem Diabetes mellitus die zweithäufigste Ursache für eine Dialysepflichtigkeit oder Nierentransplantation darstellt (Klag et al. 1996). Besteht ein dauerhaft erhöhter Blutdruck und somit ein erhöhter glomerulärer Kapillardruck, reagieren die Zellen des Mesangiums auf die gesteigerte mechanische Belastung mit einer vermehrten Synthese von extrazellulärer Matrix (Riser et al. 1992, Peng et al. 2007). Es kommt zur Nephrosklerose, welche charakterisiert ist durch histopathologische Veränderungen wie die Verbreiterung der Intima von Arterien, der Hyalinose von Arteriolen sowie dem ischämischen Untergang von Glomeruli, welche zur Glomerulosklerose, interstitieller Fibrosierung und Atrophie der Nierentubuli führt (Sumida et al. 2016). In der Folge ist die hypertensive Nephrosklerose ein häufiger Grund terminaler Niereninsuffizienz in den sogenannten entwickelten Ländern (Liang et al. 2016).

### 1.4.3 Proteinurie

Ein wichtiger klinischer Faktor auf den bei Patienten mit arterieller Hypertonie ein Augenmerk zu richten ist, ist das Auftreten einer Proteinurie. Sie findet sich bei Hypertonikern etwa dreimal häufiger als bei Gesunden (Kannel et al. 1984). Proteinurie zeigt eine endotheliale Dysfunktion an, welche mit einer gesteigerten vaskulären Permeabilität für Eiweiße einhergeht (Schmieder et al. 2006). In verschiedenen Studien wurde zudem gezeigt, dass das Auftreten sowie das Ausmaß einer Proteinurie in signifikantem Zusammenhang mit der kardiovaskulären Gesamtmorbidität und –mortalität steht (Kannel et al. 1984, Ruilope 2002, Schmieder et al. 2006). Der klinisch als erstes erfassbare Schaden der Niere ist der Nachweis einer Mikroalbuminurie.

Jedoch ist das Vorliegen einer Proteinurie nicht nur ein Parameter zur Einschätzung eines bestehenden Nierenschadens, sondern bedingt selbst eine direkte pathogene Wirkung im Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung. Dabei ist der nephrotoxische Effekt umso größer je unselektiver und ausgeprägter die Proteinurie ist (Cravedi und Remuzzi 2013). Pathophysiologisch führt eine arterielle Hypertonie wie oben beschrieben zur Nephrosklerose und dauerhafter Schädigung des Nierenparenchyms sowie Verlust von Glomeruli. Hierbei entwickelt sich ein Circulus vitiosus mit weiter steigendem glomerulärem Filtrationsdruck über den verbleibenden Glomeruli. Es kommt zur Dysfunktion bzw. Untergang der Podozyten und somit einer gesteigerten Permeabilität für Makromoleküle. Die Folge ist eine vermehrte Filtration von Plasmaproteinen und das Auftreten einer Proteinurie. Gleichzeitig kommt es zu einer exzessiven Reabsorption dieser Plasmaproteine, welche die Ausschüttung von vasoaktiven und inflammatorischen Proteinen bedingt. Es resultiert die Apoptose tubulärer Zellen, die Infiltration mit mononukleären Zellen sowie die Akkumulation von Extrazellulärmatrix im Interstitium. Es kommt somit zur Progression der Nephrosklerose und zu einer Reduktion der GFR (vgl. Cravedi und Remuzzi 2013).



## **1.5 Rolle des sympathischen Nervensystems in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie**

Ein Zusammenhang zwischen dem sympathischen Nervensystem und arterieller Hypertonie ist seit langem bekannt. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, als medikamentöse Therapiemöglichkeiten noch sehr eingeschränkt bestanden, führten Adson und Brown im Jahre 1934 erstmals eine operative subdiaphragmale Sympathektomie durch (Page und Heuer 1935). Diese Therapie der Ultima Ratio erzielte eine eindruckliche und dauerhafte Senkung des arteriellen Blutdrucks sowie eine Reduktion der Mortalität. Jedoch mussten beträchtliche Nebenwirkungen in Kauf genommen werden, wie eine ausgeprägte orthostatische Hypotonie, Gangunsicherheit, Tachykardien bzw. Palpitationen, gastrointestinale Beschwerden sowie Impotenz (Sudano et al. 2011). Mit der Entwicklung wirksamer antihypertensiver Medikamente rückten interventionelle Maßnahmen in den Hintergrund. Doch auch die moderne Medizin sieht sich mit dem Problem konfrontiert, dass ein gewisses Patientenkollektiv mit arterieller Hypertonie unter medikamentöser Therapie keine adäquate Senkung des Blutdrucks innerhalb des Zielbereiches erreicht. In diesem Zusammenhang rückte in den letzten Jahrzehnten erneut das sympathische Nervensystem in den Fokus der Forschung. Wissenschaftlich etablierte Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Aktivität sympathischer Nerven sind die Bestimmung der regionalen Norepinephrin-Freisetzung, dem dominierenden Neurotransmitter dieses Nervensystems, sowie die Aufzeichnung mikroneurographischer Signale einzelner oder gebündelter sympathischer Nerven in Gefäßwänden Haut und Skelettmuskeln versorgender Gefäße (Parati und Esler 2012). Es konnte so ein eindeutiger gleichsinniger Zusammenhang zwischen dem Maß der Überaktivität des sympathischen Nervensystems und der Ausprägung einer essentiellen arteriellen Hypertonie detektiert werden (Grassi 2009). Es wird davon ausgegangen, dass es bei der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie zu einer Störung des Natrium- und Wasserhaushaltes kommt, sodass ein erhöhter arterieller Druck nötig ist, um ein Gleichgewicht im Natrium- und Wasserhaushalt wiederherzustellen und aufrechtzuerhalten (Kopp 2011). Ein im besonderen Maße beteiligtes Organ sind die Nieren. Eine vermehrte Aktivität in efferenten sympathischen Nervenfasern führt zu einer Verringerung des renalen Blutflusses und der Natriumausscheidung über den Harn sowie zur Steigerung der Sekretion von Renin (Kopp 2015). Physiologischerweise

besteht ein inhibitorischer renorenal Reflex zwischen sympathischen Efferenzen und mechanosensorischen Afferenzen in dem Maße, dass die Aktivierung solcher Afferenzen zur Abschwächung der sympathischen Aktivität führt und es so zur gesteigerten Natriumexkretion über den Urin kommt (Kopp 2015). Unter pathophysiologischen Bedingungen mit erhöhter Natriumretention, wie bei der arteriellen Hypertonie oder Erkrankungen, welche mit der Ausbildung renaler Ödeme einhergehen, wie der dekompensierten Herzinsuffizienz und dem nephrotischen Syndrom, kommt es zur Überaktivität des efferenten sympathischen Nervensystems. Begründet findet sich dies in einer Schwächung der aortalen und arteriellen Baroreflexe. Zudem ergeben sich in neueren Studien Hinweise, dass eine Schädigung der Nieren zu einer Umkehr der inhibitorischen zu exzitatorischen renorenal Reflexe führt, sodass eine Aktivierung mechanosensorischer Afferenzen die Überaktivität des sympathischen Nervensystems zusätzlich verstärkt, und es so zur vermehrten Natriumretention und Steigerung des arteriellen Blutdrucks kommt (Kopp 2015).

## **1.6 Interventionelle Therapieoptionen**

Für Patienten, die die Kriterien einer therapierefraktären arteriellen Hypertonie erfüllen, empfehlen die Leitlinien der „European Society of Hypertension“ (ESH) (IIb-Empfehlung) den Einsatz interventioneller Verfahren wie der renalen Denervation bzw. der Barorezeptorenstimulation (Mancia et al. 2013).

### **1.6.1 Barorezeptorenstimulation (BAT)**

Die Barorezeptorenstimulation ist eine Therapieoption, deren Ziel in der Senkung der Überaktivität im sympathischen Nervensystem liegt. Im Sinus caroticus und dem Aortenbogen nehmen arterielle Barorezeptoren Dehnungsreize wahr, welche durch Steigerung des arteriellen Blutdrucks während der Systole entstehen. Dies hat zur Folge, dass afferente Nervenimpulse in den Nucleus tractus solitarii im zentralen Nervensystem abgegeben werden, und so reflexhaft die Aktivität efferenter sympathischer Nerven gesenkt wird. Resultierend sind eine negative Inotropie am Herzen, eine periphere Vasodilatation sowie eine verminderte Reninsekretion. Weiterhin führt dies zur Stimulation parasympathischer Nerven, und somit zur

Reduktion der Herzfrequenz. Die externe Barorezeptorenstimulation erfolgt durch die Implantation einer unipolaren Elektrode, welche operativ an den rechten Karotissinus angelegt wird. Diese ist mit einem Pulsgenerator verbunden, der subkutan im Bereich der Arteria subclavia zu liegen kommt (Ng et al. 2016). Eine dauerhafte Senkung des Blutdrucks von im Mittel 30 mmHg über 22 bis 52 Monate konnte in der Langzeitauswertung des „Rheos Pivotal Trial“ gezeigt werden (Bakris et al. 2012). Derzeit wird eine Weiterentwicklung dieser Technologie, das „Barostim neo<sup>TM</sup>-System“ verwendet. Die hypertensiologische Studiengruppe an der Universitätsmedizin Göttingen, konnte bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zusätzlich einen nephroprotektiver Effekt durch Senkung des arteriellen Blutdrucks, Reduktion der Proteinurie sowie Stabilisierung der berechneten glomerulären Filtrationsrate nachweisen (Wallbach et al. 2014).

### **1.6.2 Renale Denervation (RD)**

Das interventionelle Therapieverfahren, das zur Therapie der therapierefraktären arteriellen Hypertonie eingesetzt wird, mit der bisher dichtesten Studienlage ist die renale Denervation. Auch hier wird einer sympathischen Überaktivität entgegengewirkt (Ewen et al. 2013). Mittels Kathetersystemen wird über Punktion der Arteria femoralis die Nierenarterie erreicht, und dort Radiofrequenz- oder Ultraschall-Energie abgegeben. Hierdurch kommt es zur fokalen Erwärmung der arteriellen Gefäßwand, und zur Zerstörung der in der Adventitia gelegenen efferenten und afferenten renalen Nerven. Der Verlust efferenter sympathischer Nerven resultiert in einer verringerten Reninsekretion, renaler Gefäßdilatation sowie vermehrter Natriumexkretion (Ng et al. 2016). Durch die zusätzliche Destruktion afferenter mechanosensorischer Nerven werden exzitatorische renorenale Reflexe gemindert. Diese entstehen unter pathologischen Bedingungen, die mit einer Schädigung der Nieren einhergehen, wie die arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, chronischem Nierenversagen, Diabetes und Übergewicht. Die hierbei häufig bestehende chronische Entzündung der Nieren führt zu einer Stimulation chemosensitiver Nerven und zur Verstärkung der sympathischen Nervenaktivität (Kopp 2015). Die erste SYMPPLICITY HTN-1-Studie im Jahr 2009, konnte bei 45 eingeschlossenen Patienten eine mittlere Blutdruckreduktion um -22/-11 mmHg nach sechs Monaten und um -27/-17 mmHg nach zwölf Monaten

dokumentieren. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Noradrenalinausschüttung um 47 % (Krum et al. 2009). In die nachfolgende SYMPPLICITY HTN-2-Studie ein Jahr darauf wurden 106 Patienten eingeschlossen. An 52 Patienten wurde interventionell die renale Denervation durchgeführt, während 54 Patienten der Kontrollgruppe ihre medikamentöse antihypertensive Therapie fortführten. Nach sechs Monaten konnten je 94 % beider Gruppen nachuntersucht werden. Hier zeigte sich eine Reduktion arterieller Blutdruckwerte im Mittel um  $-32/-12$  mmHg in der interventionell behandelten Gruppe. 84 % dieser Patienten erreichten eine Blutdruckreduktion um 10 mmHg oder mehr, während dies in der Kontrollgruppe bei lediglich 35 % der Patienten der Fall war. Die Blutdruckmittelwerte zeigten sich in der nicht-interventionell behandelten Gruppe vom Ausgangspunkt unverändert (Simplicity HTN-2 Investigators et al. 2010). Bis zum Jahr 2014 waren alle Studien zur renalen Denervation als offene nicht-verblindete Studien durchgeführt worden, sodass die Kritik eines möglichen Placeboeffektes bestand, insbesondere begründet durch die Invasivität des Eingriffes. Die SYMPPLICITY HTN-3-Studie welche im Frühjahr 2014 publiziert wurde, wandte erstmalig ein randomisiertes placebokontrolliertes Design an. Es wurden 535 Patienten im Verhältnis 2:1 randomisiert, und einfachverblindet zwei Gruppen zugeteilt. In einer Gruppe wurde die renale Denervation angewandt, während in der anderen lediglich eine Nierenarteriographie durchgeführt wurde. Nach sechs Monaten zeigten sich bei Patienten nach renaler Denervation die Blutdruckwerte um  $-14,13 (\pm 23,93)$  mmHg systolisch und  $-6,6 (\pm 11,9)$  mmHg diastolisch reduziert. In der Gruppe von Patienten in der das Placebo-Verfahren angewendet worden war, ergab sich ebenfalls eine Blutdrucksenkung um  $-11,74 (\pm 25,95)$  mmHg systolisch und  $-4,6 (\pm 13,6)$  mmHg diastolisch. Mit der Differenz von  $-2,39$  mmHg zwischen den gemittelten systolischen Blutdruckwerten bestand somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auch im Vergleich der 24-Stunden-Blutdruckmessung ergab sich lediglich eine Differenz von  $-1,96$  mmHg der renal denervierten Gruppe gegenüber der placebobehandelten Gruppe. Die Blutdrucksenkung belief sich hier auf  $-6,75 (\pm 15,11)$  mmHg systolisch und  $-4,1 (\pm 9,2)$  mmHg diastolisch nach renaler Denervation, und  $-4,79 (\pm 17,25)$  mmHg systolisch und  $-3,1 (\pm 10,1)$  mmHg diastolisch in der Vergleichsgruppe. Die primären Effektivitätspunkte konnten in dieser Studie somit nicht erreicht werden. Der primäre Sicherheitsendpunkt der Studie wurde erzielt. Dieser wurde definiert als das Auftreten in weniger als 9,8 % behandelter Patienten von Todesfällen jeglicher Ursache, terminales Nierenversagen, embolische Ereignisse mit

Organversagen, Nierenarterien- oder andere vaskuläre Komplikationen, hypertensive Krisen innerhalb von 30 Tagen oder Nierenarterienstenosen von über 70 % innerhalb von 6 Monaten. Lediglich bei fünf Patienten (1,4 %) kam es zu unerwünschten Ereignissen nach renaler Denervation. In der Kontrollgruppe kam es bei einem Patienten (0,6 %) zu einem solchen Ereignis (Bhatt et al. 2014). Dieses überraschende und früheren Studien entgegenstehende Ergebnis führte zu wissenschaftlichen Diskussionen und bedarf weiterer Forschung. Stellungnahmen der deutschen Hochdruckliga zusammen mit den deutschen Gesellschaften für Kardiologie, Angiologie, Nephrologie und Radiologie empfehlen die Anwendung invasiver Verfahren wie der renalen Denervation nur bei gesichertem therapieresistentem Bluthochdruck bei Werten von systolisch  $\geq 160$  mmHg oder diastolisch  $\geq 110$  mmHg und nach Ausschluss einer Pseudoresistenz durch Langzeitblutdruckmessung. Zudem sollte die Diagnostik und Nachverfolgung auf spezialisierte Zentren beschränkt bleiben sowie die Durchführung invasiver Verfahren erfahrenen Interventionalisten vorbehalten bleiben. Die renale Denervation ist bei konservativ therapieresistenten Patienten im Einzelfall als zusätzliches Verfahren zu sehen (Vonend et al. 2015).

### **1.6.3 Weitere interventionelle Therapieverfahren**

Zu weiteren interventionellen Therapieverfahren zur Behandlung therapieresistenter Hypertonie besteht derzeit zu geringe Evidenz bei noch limitierter Datenlage um eine breitere klinische Anwendung zu ermöglichen. Sie sollen an dieser Stelle lediglich genannt werden. Die Ablation des Glomus caroticum soll erhöhte efferente Signale dieser Paraganglien verhindern. Die Anlage einer proximalen Anastomose zwischen der Arteria iliaca externa und der Vena iliaca interna zielt darauf ab, das effektive systolische Blutvolumen und den systemischen Gefäßwiderstand zu reduzieren. Diskutiert werden weiterhin eine tiefe Hirnstimulation, eine Stimulation des Nervus medianus und des Nervus vagus (Ng et al. 2016).

## **1.7 Fragestellung**

Die renale Denervation könnte über Hemmung des sympathischen Nervensystems zu einer Reduktion des arteriellen Blutdrucks beitragen, was eine ausgesprochen große

Bedeutung für die Vermeidung von Endorganschäden bei Patienten mit therapierefraktärer arterieller Hypertonie darstellen könnte.

Die im folgenden präsentierte Studie wurde im April 2013 initiiert, noch vor der Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie. Die renale Denervation war zu diesem Zeitpunkt bereits, nach erfolgtem Wirksamkeitsnachweis in großen Studien, in der klinischen Routine der interdisziplinären Behandlung therapieresistenter Hypertonie in Deutschland integriert. Primäres Ziel der vorliegenden Studie ist es, das kardio-reno-vaskuläre Risiko von Patienten mit therapierefraktärer arterieller Hypertonie einzuschätzen und potentielle organoprotektive Effekte der renalen Denervation zu evaluieren. Als sekundäres Ziel sollte die Effektivität der renalen Denervation hinsichtlich der Blutdruckregulation untersucht werden. Es ist derzeit noch unklar, welche Patienten von der renalen Denervation profitieren, so dass Prädiktoren für ein mögliches Nicht-Ansprechen auf die Therapie (sogenannte Non-Responder) identifiziert werden sollen.

Die vorliegende Dissertationsarbeit befasst sich insbesondere mit nephrologischen Endpunkten. Mittels klinischer und experimenteller Methoden sollen Marker renovaskulärer Schädigung bei therapierefraktären Hypertonikern erfasst werden sowie deren Beeinflussung durch eine renale Denervation untersucht werden. Laborchemische Untersuchungen dienen der Einschätzung der Nierenfunktion. Eine glomeruläre Schrankenstörung soll durch Urinanalysen erfasst werden. Weiterhin soll durch die Untersuchung der Quantität und Funktionalität zirkulierender endothelialer Progenitorzellen die Fähigkeit der Gefäßendothelien zur Regeneration ermittelt werden, um mögliche Zusammenhänge zwischen Veränderungen des Blutdruckniveaus und der endogenen Regenerationsfähigkeit zu eruieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
CD133 Antibody (Rabbit anti CD133 antibody)	EMELCA Bioscience Breda Niederlande	1009-25	MBS462020
Flk-1, Carboxyfluorescein- conjugated Mouse Ig G1 Monoclonal Anti- human VEGF, KDR- Fluorescein;  Clone # 89106	R&D Systems Minneapolis, USA	LWS08	FAB357F
c-Kit (Ab81) Mouse monoclonal Anibody, Alexa Fluor ® 488 Conjugate	Cell Signaling Technology Danvers USA	6	3310S
<i>Sekundärer PE- Antikörper für CD 133:</i>  R-Phycoerythrin- conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti- Rabbit IgG (H+L)	Dianova (Jackson Immuno Research) West Grove USA	109337	111-116-144

Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
Isotypkontrolle: IgG1-FITC / IgG2a- PE	Immunotech SAS Beckman Coulter Marseille France	16	PN A10974
FcR Blocking Reagent (human)	MACS Miltenyi Biotec Auburn USA	120 000 442	130-059-901
Anti-eNOS ; Purified Mouse Anti- eNOS/NOS Type III	BD Bioscience San Diego USA		610296
Northern Light 637 Anti Mouse Ig G	R&D Systems Minneapolis, USA	LZ006	NL 008
DAPI: 4',6-diamidino- 2-phenylindole, dihydrochloride	Molecular Probes Thermo Fisher Scientific Waltham USA		D1306

### 2.1.2 Biologisches Material

Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
Fibronectin (from human plasma) 0,1% solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Schnelldorf Deutschland	081M7033	F0895-1MG



Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich	G16113-622	K41-001-500

### 2.1.3 Lösungen, Medien, Chemikalien

Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
PBS Dulbeco	Biochrom AG Berlin Deutschland	0943 B	L1825
Nuclease Free Water	Thermo Fisher Scientific Waltham USA	1211109	AM9932
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Berlin Deutschland	0512 B	L6115
CFU-Hill Medium Supplements	Stemcell Technologies Köln Deutschland	12A42659	05902
CFU-Hill Basal Medium	Stemcell Technologies Köln Deutschland	13G50734	05901
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe Deutschland	141167943	49792

Name	Hersteller	Chargennummer	Artikelnummer
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim Deutschland		9002-93-1

#### 2.1.4 Gebrauchswaren

Name	Hersteller	Artikelnummer
Pipetten: Eppendorf Research ® (0,5-10 µl, 10-100 µl, 30-300 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG Hamburg Deutschland	0,5-10 µl: 3120000020 10-100 µl: 3120000046 30-300 µl: 3120000100 100-1000 µl: 3120000909
Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG&Co Nümbrecht Deutschland	2,5 µl: 70.760.212 100 µl: 70.1130.212 1000 µl: 70.762.211
Sterile Pipetten für elektrische Pipettierhilfen: Sterile Serological Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen Deutschland	2 ml: 05020301 5 ml: 13041171 10 ml: 14020551 25 ml: 14070741
E-cups: Eppendorf Tubes (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG Hamburg Deutschland	1,5 ml: 0030125.150 2,0 ml: 0030 120.094

Name	Hersteller	Artikelnummer
Cellstar Tubes (15 ml,20 ml)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen Deutschland	15 ml: 188271 20 ml: 227261
Leucosep™ Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen Deutschland	227290
FACS-Röhrchen (5,0 ml)	Sarstedt AG&Co Nümbrecht Deutschland	55.476
Steriler Filter: Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG&Co Nümbrecht Deutschland	83.1826.001
6-Well Cluture Plate	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen Deutschland	657 160
24-Well Cluture Plate	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen Deutschland	662 160

### 2.1.5 Geräte und Software

Name	Bezeichnung/Hersteller
Sterilbank: Hera Safe	Typ HS 12/2 Heraeus Instruments Hanau, Deutschland

Name	Bezeichnung/Hersteller
Zentrifuge	Sigma 3-18K Sigma Laborzentrifugen GmbH Osterode am Harz, Deutschland
Mikroskop	Diavert; Serien Nr.: 043641 Leica Service Benzheim, Deutschland
Kontrast-Fluoreszenz Mikroskop	Axiovert S100 TV Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Computer	Optiplex 780, DELL GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
Software: Cell D 5.1	Olympus Europe Hamburg, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Modell-Nr.: MCO-19AICUV-PE Panasonic Healthcare Co., Ltd. Tokyo, Japan
Wasserbad	Schütt Labortechnik Göttingen, Deutschland
Vortexer	Typ VF2 Janke&Kunkel IKA Labortechnik Staufen Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe: Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Tiefe 0,100mm; 0,0025mm <sup>2</sup> , 0,0625mm <sup>2</sup>
Durchflusszytometer	FACS Calibur™ Becton Dickinson New Jersey, USA
Software: BD Cell Quest™	Becton Dickinson New Jersey, USA
iCYS Laserscanning Zytometer	Compucyte / Beckman Coulter Indianapolis, USA

Name	Bezeichnung/Hersteller
Software: iCYS 3.4.12.92	Compucyte / Beckman Coulter Indianapolis, USA
MTS Oberarm Blutdruckmessgerät	Medisana AG Neuss, Deutschland
Blutdruckmonitor	Modell 90207 Spacelabs Medical Healthcare Snoqualmie, USA
Ultraschall-Doppler	Acuson S2000™ Ultrasound System Modell Nr.: 10041461 Siemens Medical Solutions USA Malvern, USA

## 2.2 Formale Kriterien

### 2.2.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine monozentrische, prospektive, klinisch-experimentelle Beobachtungsstudie mit nicht-randomisiertem Design. Die Studie wurde von den Kliniken für Nephrologie und Rheumatologie sowie Kardiologie und Pneumologie durchgeführt. Die gemeinschaftlich und getrennt erhobenen Endpunkte sind unter 2.2.5 aufgelistet sowie im Detail unter 6.0 beschrieben.

Die kardiologischen Endpunkte werden in der Dissertationsarbeit von Paul Schulze-Brock dargestellt.

### 2.2.2 Ethik

Die Durchführung der Studie wurde von der örtlichen Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen anerkannt (Ethikvotumnummer: 14/1/13). Alle Patienten erklärten nach Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

### **2.2.3 Patienten**

Die Patienten wurden über ihren ambulanten oder stationären Kontakt mit den Abteilungen Nephrologie/Rheumatologie bzw. Kardiologie/Pneumologie in die Studie eingeschlossen. Nach den erläuterten gültigen Kriterien bestand eine therapierefraktäre arterielle Hypertonie mit nicht leitliniengerechter Blutdruckeinstellung. Die Indikation zur renalen Denervation wurde durch die behandelnden Ärzte gestellt.

#### **2.2.4 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie**

Folgende Kriterien mussten zum Einschluss in die Studie gegeben sein:

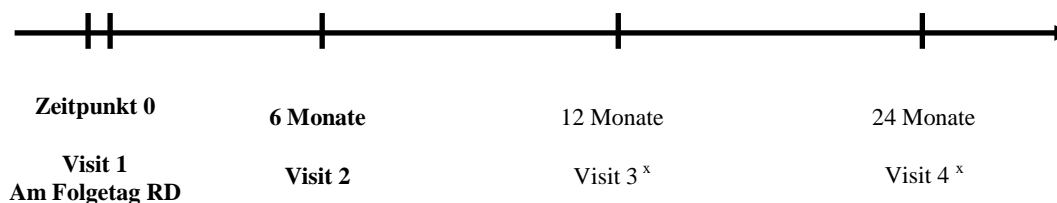
- Therapierefraktäre arterielle Hypertonie bestätigt
- Indikation zur renalen Denervation besteht
- Alter über 18 Jahre
- Einwilligungsfähigkeit gegeben
- Einverständniserklärung vorliegend

Folgende Kriterien widersprachen einer Aufnahme in die Studie:

- Ablehnung der Studienteilnahme
- Volljährigkeit noch nicht erreicht
- Schwangerschaft , Stillzeit, Kinderwunsch
- Unbehandelte sekundäre Hypertonie
- Umstände, die die Durchführung oder Interpretation der Messgrößen stören, wie z.B. Gehbehinderung, Querschnittslähmung, stark einschränkende Atemwegserkrankung, stark schwankende Blutdruckwerte usw.
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung innerhalb von vier Wochen bzw. vier Halbwertszeiten eines zu untersuchenden Medikamentes (außer Teilnahme am deutschlandweiten GREAT (German Renal Denervation Register) – Register
- Suchtkranke
- Begleiterkrankungen, die eine Nachverfolgung über einen Zeitraum von mehr als drei Jahren nicht erwarten lassen

### 2.2.5 Studienverlauf und Studienendpunkte

Der Studienverlauf sah die folgende Vorgehensweise vor:



**Tabelle 1:** Studienverlauf und erhobene Studienparameter

<b>Renale Denervation</b>	<b>Vor</b>	<b>Nach</b>	<b>Nach</b>	<b>Nach</b>
Visite	1	2	3 <sup>x</sup>	4 <sup>x</sup>
Monat	bis -1	6 ± 1	12 ± 2	24 ± 2
Aufklärung	X			
Einwilligung	X			
Einschluss-/Ausschluss-Kriterien	X			
Demographie/ Eigenanamnese	X			
Zwischenanamnese		X	X	X
Vitalzeichen	X	X	X	X
Komplette körperliche Untersuchung	X		X	X
Kurze körperliche Untersuchung		X		
Größe/Gewicht	X	X	X	X
Vor-/Begleitmedikation	X	X	X	X



<b>Renale Denervation</b>	<b>Vor</b>	<b>Nach</b>	<b>Nach</b>	<b>Nach</b>
Labor <sup>1</sup>	X	X	X	X
Schwangerschaftstest <sup>2</sup>	X			
Biomarker <sup>3</sup>	X	X		
Endotheliale Progenitor Zellen (EPCs) <sup>4</sup>	X	X		
EKG und LZ-EKG <sup>y</sup>	X	X	X	X
LZ-RR	X	X	X	X
Echokardiographie <sup>y</sup>	X	X	X	X
Nierenarteriendoppler	X	X		
6-Minuten-Gehtest <sup>y</sup>	X	X	X	X
Schlafapnoe-Screening (ambulant) <sup>y</sup>	X	X <sup>5</sup>	X <sup>5</sup>	X <sup>5</sup>
Lebensqualität, Angst (Fragebögen) <sup>y</sup>	X	X	X	X

<sup>1</sup> Routine: kleines Blutbild, Quick, pTT, GOT, GPT, AP,  $\gamma$ -GT, CRP, Na, K, Calcium gesamt, CK, eGFR, Kreatinin (nephrologisch erhobene Parameter)

Urinalanalytik: Protein ges., Albumin, IgG,  $\alpha$ -1-Mikroglobulin, Kreatinin, Natrium (nephrologisch erhobene Parameter)

<sup>2</sup> bei Frauen im gebärfähigen Alter

<sup>3</sup> BNP, ANP, Plasmareninaktivität, Aldosteron, Serum für Adipokine, TNF- $\alpha$ , IL-6 (kardiologisch erhobene Parameter)

<sup>4</sup> PBMCs, EPC-Proliferation und Quantifizierung (nephrolog. erhobene Parameter)

<sup>5</sup> wird nur durchgeführt, falls initial pathologisch

<sup>x</sup> Visit 3 und Visit 4 sind nicht mehr Teil dieser Arbeit

<sup>y</sup> im Rahmen des kardiologischen Studienteils erhobene Untersuchungen

### **2.2.6 Renale Denervation**

Die renale Denervation erfolgte mit Hilfe des vom Hersteller Medtronic bereitgestellten „Symplicity<sup>TM</sup> renal denervation system“. Dieses besteht aus einem steuerbaren Ablationsskatheter sowie einem Generator, der die Abgabe von Radiofrequenz-Energie über die Katheterspitze automatisch kontrolliert und regelt. Über die Arteria femoralis wurde der Katheter in die Nierengefäße eingebracht. Dort konnten unter Sicht in der Durchleuchtung mit Kontrastmittel fünf bis sieben Ablationspunkte in beiden Nierenarterien spiralförmig gesetzt werden. Über Elektroden in der Spitze des Katheters wurde Radiofrequenz-Energie appliziert, welche zu einer fokalen Erwärmung von 45 bis maximal 70 °C führte mit dem Ziel in der Adventitia gelegene sympathische Nervenfasern zu veröden. Durch den hohen intraluminalen Blutfluss wurde das Gefäß gleichzeitig gekühlt. Der Eingriff dauerte etwa 40 bis 60 Minuten. Eine adäquate Schmerzmedikation mit einem Opioid wurde für die Prozedur verabreicht. Die Punktionsstelle wurde anschließend mit einem Druckverband für mindestens sechs Stunden versorgt.

## **2.3 Klinische Methoden**

### **2.3.1 Eigenanamnese**

Bei jeder Vorstellung der Patienten erfolgte ein ausführliches Anamnesegespräch, in dem mögliche Symptome und Zeichen der Hypertonie erfragt wurden. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, bisherige bzw. im Studienverlauf durchgeführte kardiovaskuläre Interventionen, kardiale Diagnosen sowie insbesondere vaskuläre und zerebrovaskuläre Nebendiagnosen, aber auch Befunde wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Depression oder Malignome wurden erfasst. Der Genussmittelkonsum von Nikotin und Alkohol wurde erfragt.

### **2.3.2 Körperliche Untersuchung**

Die Patienten wurden hinsichtlich folgender klinischer Parameter untersucht: Körpergröße und Gewicht sowie Umfang der Taille und Hüfte wurden gemessen. Blutdruck und Herzfrequenz wurden nach 10-minütiger Ruhe im Sitzen dreimalig mit einem automatischem Blutdruckmessgerät des Herstellers Medisana gemessen und daraus der Mittelwert errechnet. Eine Auskultation der Lunge sowie eine Inspektion auf periphere Ödeme wurden durchgeführt.

### **2.3.3 Technische Untersuchungen**

#### **2.3.3.1 Langzeit-Blutdruckmessung**

Bei allen Patienten wurde vor der renalen Denervation eine Langzeit-Blutdruckmessung über 24 Stunden erhoben. Diese sah automatisierte Messungen wie folgt vor: in der Zeit von 6-22 Uhr alle 15 Minuten, von 22-24 Uhr alle 20 Minuten sowie von 0-6 Uhr alle 30 Minuten. Kam es zu Fehlmessungen, wurde die Messung nach zwei Minuten wiederholt. Die Armmanschettengröße wurde entsprechend des Oberarmumfanges der Patienten ausgewählt. Erfolgte die Langzeitblutdruckmessung über die nephrologische Ambulanz der Universitätsmedizin Göttingen, wurde der ambulante Blutdruckmonitor (Modell 90207) von Spacelabs Medical Healthcare verwendet, in der Kombination mit der entsprechenden Software, dem Berichtmanagementsystem für ambulante Blutdruckmonitore. Zur Kontrolluntersuchung nach sechs Monaten nach erfolgter renaler Denervation, brachte die Mehrheit der Patienten eine hausärztlich durchgeführte Langzeitblutdruckaufzeichnung mit. War dies nicht der Fall, erhielten die Patienten erneut einen Blutdruckmonitor der hauseigenen Ambulanz über 24 Stunden mit nach Hause.

#### **2.3.3.2 Nierenarteriendopplersonographie**

Zum Ausschluss einer Nierenarterienstenose oder anatomischen Besonderheiten, welche eine Kontraindikation für eine renale Denervation ergeben hätten, erhielten alle Patienten vor Einschluss in die Studie eine beidseitige dopplersonographische

Untersuchung der Nierenarterien. Diese wurde mit dem Gerät Acuson S2000<sup>TM</sup> der Firma Siemens Medical Solutions USA durchgeführt.

### 2.3.3.3 Laborparameter

Den Patienten wurden etwa 60 ml Blut abgenommen, sowie eine Urinprobe von etwa 50-100 ml. Die Analytik der oben aufgeführten Parameter fand in zertifizierten UMG-Laboren sowie im nephrologischen Speziallabor statt. Eine Teilmenge der Proben wurde für weitere Messungen asserviert. Etwa 6 ml Serum wurden in 12 E-cups à 500 µl bei -20 °C eingefroren, und etwa 50 ml Urin wurden nach Zentrifugation bei -80 °C konserviert.

#### 2.3.3.3.1 Berechnete glomeruläre Filtrationsrate - Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR)

Die Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz erfolgt meist auf Grundlage der eGFR. Es handelt sich dabei um einen Wert, der aus einfach zu erhebenden Größen errechnet wird und eine Einschätzung der Funktionsfähigkeit der Nieren erlaubt. Die Berechnung der eGFR im Rahmen dieser Studie erfolgte auf der Grundlage der MDRD-Formel (*Modification of Diet in Renal Disease*). Diese erlaubt bei moderaten bis schweren Funktionseinschränkungen eine relativ genaue Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate, standardisiert auf eine Körperoberfläche von 1,73 m<sup>2</sup>.

#### MDRD-Formel:

$$eGFR \text{ (männlich)} = 186 \times P\text{-Kreatinin}^{-1.154} \times \text{Alter in Jahren}^{-0.203}$$

$$eGFR \text{ (weiblich)} = 186 \times P\text{-Kreatinin}^{-1.154} \times \text{Alter in Jahren}^{-0.203} \times 0.742$$

(Levey et al. (2003))

#### 2.3.3.3.2 Protein im Urin

Bei allen Patienten wurde der Urin laborchemisch auf das Vorliegen einer Proteinurie untersucht. Dabei wurde die Menge des Gesamtproteins im Spontanurin bestimmt sowie die Anteile an Albumin, Immunglobulin G und alpha-1-Mikroglobulin. Um die

Spezifität der Messung zu erhöhen, wurde zudem der Protein-Kreatinin-Quotient sowie der Albumin-Kreatinin-Quotient errechnet. Es lässt sich hierdurch, durch Ausschaltung von Verdünnungseffekten, eine hohe Korrelation zu der quantitativen Bestimmung von Protein bzw. Albumin aus dem 24h-Sammelurin erreichen.

### 2.3.3.3.3 Laborchemische Beurteilung der Nierenfunktion

Zur weiteren laborchemischen Beurteilung der Nierenfunktion erfolgte die Bestimmung von Kreatinin und Cystatin C aus dem Serum. Im Urin wurden die Konzentrationen von Natrium und Kreatinin bestimmt, und die fraktionierte Natriumexkretion berechnet.

*Formel zur Berechnung der fraktionierten Natriumexkretion (FE) [%]:*

$$FE \text{ (Natrium)} = \frac{\text{Natrium (Urin)} \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \times \text{Kreatinin (Serum)} \frac{\text{mg}}{\text{dl}}}{\text{Natrium (Serum)} \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \times \text{Kreatinin (Urin)} \frac{\text{mg}}{\text{dl}}} \times 100$$

(Kawasaki et al. (1993))

### 2.3.3.3.4 Aldosteron-Renin-Quotient

Zum Screening der Patienten auf das Vorliegen eines primären Hyperaldosteronismus und somit sekundärer Hypertonie, wurde der Aldosteron-Renin-Quotient mit etablierten Standardmethoden im zertifizierten nephrologischen Routinelabor der Universitätsmedizin Göttingen ermittelt.

## 2.4 Experimentelle Methoden

### 2.4.1 Isolation von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

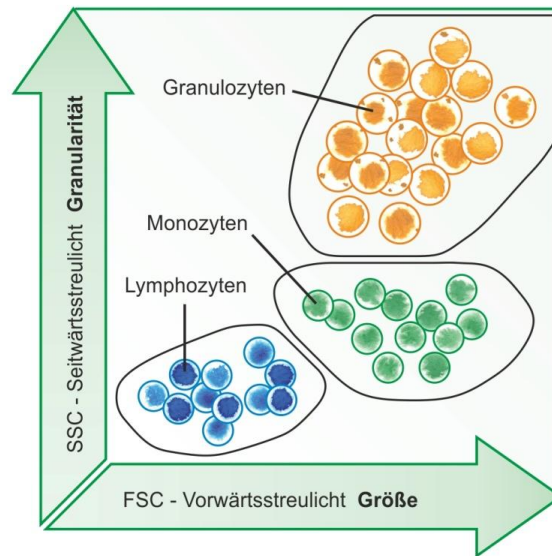
Zur Isolation der mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden etwa 10 ml Blut aus einer peripheren Vene verwendet. Die PBMCs wurden mithilfe von Leukosep© entsprechend ihrem Dichtegradienten durch Zentrifugation separiert. Durch

Zentrifugation wurde das Biocoll-Separationsmedium unterhalb von der porösen Polyethylen-Trennmembran gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe des in Lithium-Heparinat gelösten Vollblutes auf die Membran sowie die Zentrifugation ohne Abbremsung. Es entstand eine Schichtung aus Plasma, der Zellfraktion aus PBMC und Lymphozyten und dem Separationsmedium. Unterhalb der Trennscheibe sammelte sich das Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Die Schicht aus zu gewinnenden PBMCs und Leukozyten konnte nun abpipettiert werden. Es folgte ein zweimaliger Waschgang mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Zur Quantifizierung der kernhaltigen Zellen wurden diese mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

## **2.4.2 Durchflusszytometrie**

### 2.4.2.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen (EPCs)

Die Durchflusszytometrie dient der Quantifizierung und Analyse von Zellpopulationen. Mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) lassen sich fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene detektieren und entsprechend charakterisierte Zellen zählen. Das Prinzip beruht darauf, dass die markierten Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht separat detektiert wird. Das Streulicht wird unterschieden in das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), welches entsteht durch die Beugung des Lichts im flachen Winkel und Rückschlüsse auf das Volumen der Zelle schließen lässt, sowie in das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter), welches durch die Brechung des Lichts im rechten Winkel entsteht und von der Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns sowie der Menge der Vesikel in der Zelle bestimmt wird. So lassen sich die nativen Zellen des Blutes bereits charakteristisch auftrennen.



**Abbildung 2:** Charakteristische Auftrennung ungefärbter Zellen in der Durchflusszytometrie. Veränderungen der Lichtstreuung führen im Dot Plot zu einer Sortierung anhand der Merkmale Größe und Granularität.

©Johannes Erzberger (2017); Abbildung modifiziert nach: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/> (07.01.2017)

Werden die Zellen zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert, lassen sie sich anhand ihrer Oberflächenmarker näher charakterisieren. Mithilfe verschiedenfarbiger Laser und Filter werden die Fluoreszenzen angeregt und die emittierten Signale detektiert.

(Vgl. <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/> (05.02.2017))

Zur Identifizierung der EPCs wurde als standardisierte Methode die Kombination des Oberflächenmarkers CD133 und Flk-1, auch *vascular endothelial growth factor receptor 2* - VEGFR2 bzw. *kinase insert domain receptor* KDR verwendet (Lenk et al. 2011). CD133 gilt als Marker unreifer Progenitorzellen, Flk-1 als Marker endothelialer Zellen (Urbich und Dimmeler 2004). Ein weiteres Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen ist die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit, auch bezeichnet als CD117. Nahezu alle Zellen, die Flk-1 exprimieren, zeigen eine Coexpression des c-Kit-Antigens, sodass über die Kombination von CD133 mit beiden Oberflächenmarker ein sinnvoller Vergleichswert gewonnen werden konnte (Hibbert et al. 2011).

**Tabelle 2:** Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen und deren Charakteristika in der Durchflusszytometrie

Oberflächenmarker		Fluoreszenz-Emissions-Farbe	Max. Emissions-Wellenlänge [nm]
CD133 +	Marker hämatopoetischer Stammzellen	Sekundär PE gekoppelt: gelb	578
Flk-1 +	Marker endothelialer Zellen	FITC: grün	520
<b>CD133 Flk-1 ++</b>	<b>Doppelt positive Zellen zur Charakterisierung EPCs</b>		
c-Kit +	Marker hämatopoetischer Stammzellen	AlexaFluor® 488: grün	519
<b>CD133 c-Kit ++</b>	<b>Doppelt positive Zellen zur Charakterisierung EPCs</b>		

#### 2.4.2.2 Antikörperfärbungen

Zur Vorbereitung von fünf FACS-Messungen wurden 7,5 Millionen Zellen (1,5 Millionen Zellen pro Messung) gewonnen, wie unter 2.4.1. beschrieben. Nach Zentrifugation der in PBS gelösten Zellen wurden zum Pellet 500 µl 1 %ige PBS-BSA (BSA: Bovines Serumalbumin) Lösung zugegeben. Je 100 µl wurden in die fünf FACS-Röhrchen verteilt. Je 1 µl Blocking Peptid (FcR Blocking Reagent (human), MACS Miltenyi Biotec, Auburn, USA) wurde hinzugefügt, und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschgang mit je 2 ml PBS-BSA Lösung, die Zentrifugation über 5 min sowie die Entfernung des Überstandes durch Dekantieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Primärantikörper zu den entstandenen Pellets: 100 µl Rabbit anti CD133 (CD133 antibody, EMELCA Bioscience; Breda, Niederlande) in der Verdünnung 1:100 wurde in zwei Röhrchen gegeben, einmal kombiniert mit 3 µl mouse anti human Flk-1 (RD Systems, Minneapolis, USA), sowie einmal mit 2 µl mouse anti c-Kit (Cell



Signaling Technologies, Danvers, USA). Diese wurden anschließend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang mit 2 ml PBS-BSA sowie Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde je 1 µl des sekundären PE-Antikörpers für CD133 (Goat Anti-Rabbit IgG, Dianova/Jackson Immuno Research, West Grove, USA) in beide Röhrchen mit CD133 markierten Zellen gegeben, sowie in ein weiteres Röhrchen zu einer der Kontrolle dienenden, ungefärbten Zelllösung. In ein Röhrchen unbehandelter Zellen wurde 1 µl der Isotypkontrolle (IgG1-FITC / IgG2a-PE, Immunotech SAS Beckman Coulter, Marseille, France) zugegeben. Ein Röhrchen blieb nativ. Es folgte die erneute Inkubation für 10 min bei 4 °C. Anschließend wurden alle Lösungen mit 2 ml PBS-BSA gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 450 µl PBS zugeben.

#### 2.4.2.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse erfolgte mithilfe des Gerätes FACS Calibur™ der Firma Becton Dickinson. Mit der Datenerfassungs- und Analysesoftware BD Cell Quest wurden im Dot Plot (Punktwolkendarstellung) die Signale des Forward Scatters (FSC) auf der x-Achse, und die des Sideward Scatters (SSC) auf der y-Achse aufgetragen, sodass die übliche Zellverteilung nach Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten entstand. Die Population der Monozyten konnte nun mithilfe eines Gates markiert werden, und die darin enthaltenen Zellen auf ihre Fluoreszenzsignale untersucht werden. Durch Selektion eines Gates können neue Dot-Plot-Darstellungen generiert werden, wodurch es möglich ist verschiedene Merkmale miteinander zu verknüpfen. Um unspezifische Bindungen zu eruieren, wurden Dot Plots der Isotypkontrolle, sowie des sekundären PE-Antikörpers erstellt. In einem Dot Plot erfolgte die Darstellung von CD133 und Flk-1 (VEGFR2/KDR) positiven, sowie doppelt positiven Zellen. Diese Merkmale wurden zur Charakterisierung EPCs herangezogen. Um unspezifische Bindungen nicht mitzuzählen, wurde die Anzahl der vorher ermittelten Adhäsionen des sekundären PE-Antikörpers von der Anzahl der doppelt positiven Zellen subtrahiert. Ein vergleichender Wert wurde in einem weiteren Dot Plot gewonnen, in dem CD133- und c-Kit (CD117)-doppelt positive Zellen abgebildet wurden (Vgl. Weigand 2013).

### **2.4.3 Zellkultur von Colony Forming Units (CFU) endothelialer Progenitorzellen (EPCs)**

Die Isolation der PBMCs erfolgte wie oben beschrieben unter Punkt 2.2.1.3 Die Blutproben wurden am Tag der Abnahme verarbeitet.

Um die Proliferationsfähigkeit der EPCs zu bestimmen, wurde eine von STEMCELL Technologies standardisierte Methode einer Zellkultur über fünf Tage mit dem EndoCult Kit aus Zellnährlösungen angewandt, die es erlaubt, die von EPCs gebildeten Colony Forming Units (CFUs) zu quantifizieren.

Fünf Millionen Zellen pro Well wurden in Stammzellnährmedium resuspendiert. Um die Kontamination mit reifen Endothelzellen zu minimieren, wurden die Zellen zunächst auf einer mit humanem Fibronectin beschichteten 6-Well-Platte aufgebracht, und 48 Stunden inkubiert, bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> und über 95 %iger Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden nicht adhärente Zellen wieder aufgenommen, auf einer mit Fibronectin beschichteten 24-Well-Platte aufgebracht und erneut bei gleichen Bedingungen für weitere 72 Stunden inkubiert. Nach Ende der Kultur wurde das Medium entfernt, die Wells mit PBS gewaschen, und die CFUs unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Ab einer Gruppierung von drei lanzettförmigen EPCs um einen Kern aus runden Zellen wurde diese als Kolonie gezählt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung mit 2 %igem Formaldehyd.

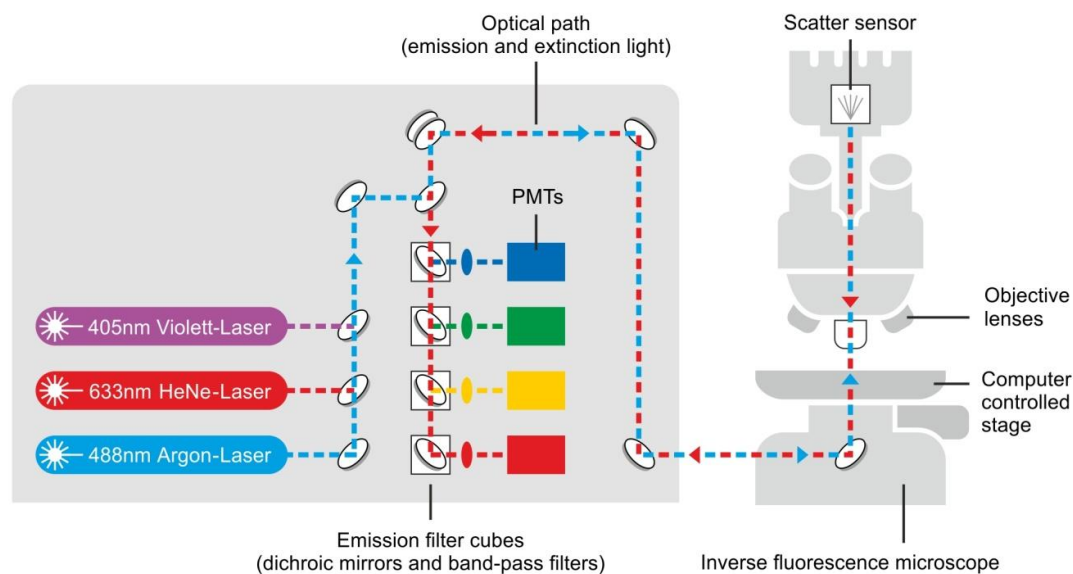
### **2.4.4 Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse**

#### **2.4.4.1 Laserscanning-Zytometrie (iCYS)**

Die eNOS-Expression der EPCs wurde mithilfe der Laserscanning-Zytometrie detektiert, welche es ermöglicht, mikroskopische Bildgebung mit den statistischen Möglichkeiten eines Durchflusszytometers zu kombinieren. Es wurde das iCYS Laserscanning Zytometer der Firma Compucyte (USA) mit der entsprechenden Software iCYS 3.4.12.92 genutzt. Zur Anregung der fluoreszenzmarkierten Antikörper werden ein blauer Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm, ein roter Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm sowie ein violetter Diodenlaser der Wellenlänge 405 nm verwendet. Die Probe wird mit der beweglichen Trägerplatte durch die Anregungslaser

geführt. Mithilfe eines dichromatischen Spiegels wird das Anregungs- und Emissionslicht voneinander getrennt. Das durch die angeregten Fluorochrome der Antikörper entstehende Emissionslicht wird mit einer Linse fokussiert, während das Anregungslicht mithilfe des dichromatischen Spiegels reflektiert wird. Das Emissionslicht wird auf Filterwürfel gelenkt, welche aus einem dichromatischen Spiegel zur Trennung der verschiedenen Wellenlängen und einem Bandpass-Filter bestehen. Die Fluoreszenzsignale werden auf einen Photomultiplier (PMT) gespiegelt, wo sie separat detektiert werden und ein digitales Signal generiert wird. Somit können verschiedene Spektralbereiche simultan gemessen und verrechnet werden. Dies ermöglichte die Kontrolle der Zellen auf die Expression von eNOS, sowie gleichzeitig auf das Vorhandensein eines Zellkerns.

(Vgl.: <http://www.bostonind.com/laboratory/microscopes-and-imaging/confocal-microscopes/compucyte-icys-laser-scanning-cytometer-with-olympus-ix71-microscope> (26.01.2017); Hoffschulte 2009)



**Abbildung 3:** Modell eines iCYS Laserscanning-Zytometers

© Johannes Erzberger (2017);

Abbildung modifiziert nach: [https://www.researchgate.net/figure/Figure-2-Block-diagram-of-a-Laser-Scanning-Cytometer\\_240630243\\_fig2](https://www.researchgate.net/figure/Figure-2-Block-diagram-of-a-Laser-Scanning-Cytometer_240630243_fig2) (07.01.2017), mit Darstellung eines Blockdiagramms der Firma CompuCyte Corporation, Cambridge, MA

#### 2.4.4.2 Immunologische Identifizierung

Die 24-Well Platten mit den fixierten EPC-CFUs (siehe Punkt 2.3.2.2.) wurden mithilfe von Antikörpern immunologisch auf die Expression von eNOS untersucht. Zur Vorbereitung wurden die Wells mit PBS gespült, welches anschließend entfernt wurde. Es erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen mit Triton-X-100 0,1 % in PBS, mit welchem die Wells für 10 min bedeckt und inkubiert wurden. Es folgte ein Waschung mit 1 %igem PBS-BSA, welches ebenfalls 10 min inkubiert und anschließend abgesaugt wurde. Im nächsten Schritt wurden die Wells bedeckt mit 300 µl der Anti-eNOS Antikörperlösung (BD Bioscience, San Diego, USA) in der Verdünnung mit PBS 1:100, und für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, die Wells mit PBS gewaschen, und 300 µl des sekundären Antikörpers Northern Light Anti-Mouse IgG-NL637 (R&D Systems, Minneapolis, USA) in der Verdünnung mit PBS 1:500 in die Wells gegeben. Es folgte eine Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, ein Waschung mit PBS durchgeführt und die Zellkernfärbung mit DAPI

(4',6-Diamidin-2-phenylindol) vorgenommen. 300 µl DAPI (Konzentration 5 <sup>mg</sup>/<sub>ml</sub>) in Verdünnung mit Aqua 1:1000 wurde in die Wells gegeben und für 10 min inkubiert. Nach Entfernen dieser Lösung wurden die Wells erneut mit PBS gewaschen und bedeckt. Anschließend erfolgte die Messung mit dem iCYS-Laserscanning-Zytometer.

#### 2.4.4.3 Software-Analyse

Die verwendeten Antikörper wiesen die folgenden Merkmale auf

**Tabelle 3:** Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen und deren Charakteristika in der Laserscanning-Zytometrie

Oberflächenmarker		Fluoreszenz-Emissions-Farbe	Max. Emissions-Wellenlänge [nm]
Anti eNOS + Sekundärer Antikörper: Northern Light Anti-Mouse IgG-NL637	Marker der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase	NL637: rot	658
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Marker von DNA/Zellkernen	blau	461

Mithilfe der iCYS-Software konnten Dot-Plots generiert werden. Auf der x-Achse wurden die blauen Signale der DAPI-Kernfärbung aufgetragen, auf der y-Achse die des roten sekundären Antikörpers gegen eNOS. Im rechten oberen Quadranten fanden sich die Zellen, welche für beide Signale positiv waren. Das System speicherte alle festgelegten Einstellungen für sämtliche durchgeführten Messungen.

## **2.5 Statistische Auswertung**

### **2.5.1 Statistische Analysen**

Alle erhobenen Daten waren im Verlauf der Studie in Tabellen des Programms Microsoft Excel 2007 gesammelt worden. Ebenso erfolgte hier die Berechnung der Differenzen der Werte von Visit I und Visit II. Die weiteren statistischen Analysen der gewonnenen Größen erfolgten mithilfe der Datenanalyse-Software STATISTICA 12.7 des Unternehmens StatSoft®. Alle ermittelten Parameter wurden auf ihre Normalverteilung getestet. Lag diese vor, so wurde zum Testen auf einen statistischen Unterschied zwischen den Zeitpunkten vor renaler Denervation sowie sechs Monate danach ein verbundener t-Test mit Bestimmung des Mittelwertes, der Standardabweichung sowie des Signifikanzniveaus  $p$  durchgeführt. Konnte keine Normalverteilung bestätigt werden, wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test angewendet. Das Signifikanzniveau für einen statistischen Unterschied wurde mit  $p=0,05$  definiert.

Aufgrund der geringen Anzahl an in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde bezüglich einiger Parameter eine Poweranalyse mit einer festgelegten Teststärke von 80 % durchgeführt, um statistisch eine Aussage zu treffen, mit welcher Anzahl von Werten das Signifikanzniveau erreicht worden wäre. Weiterhin erfolgte eine Spearman-Korrelation, um die Entwicklung des Blutdrucks unter der Berücksichtigung der Reduktion der Antihypertensiva zu betrachten.

### **2.5.2 Graphische Darstellung der Ergebnisse**

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mithilfe der Datenanalyse-Software STATISTICA 12.7. Es wurden 2D-Whiskers-Box-Plots generiert, sowie ein 2D-Balkenplot.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Patientendaten

Die demographischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs werden in den nachfolgenden Tabellen dargestellt. Weiterhin wird die Medikation zur Senkung des arteriellen Blutdrucks der Patienten beschrieben, und Veränderungen der Therapie nach erfolgter renaler Denervation aufgezeigt.

**Tabelle 4:** Stichprobengröße und Geschlechterverteilung

Stichprobengröße	12
Männlich	5 (41,7 %)
Weiblich	7 (58,3 %)

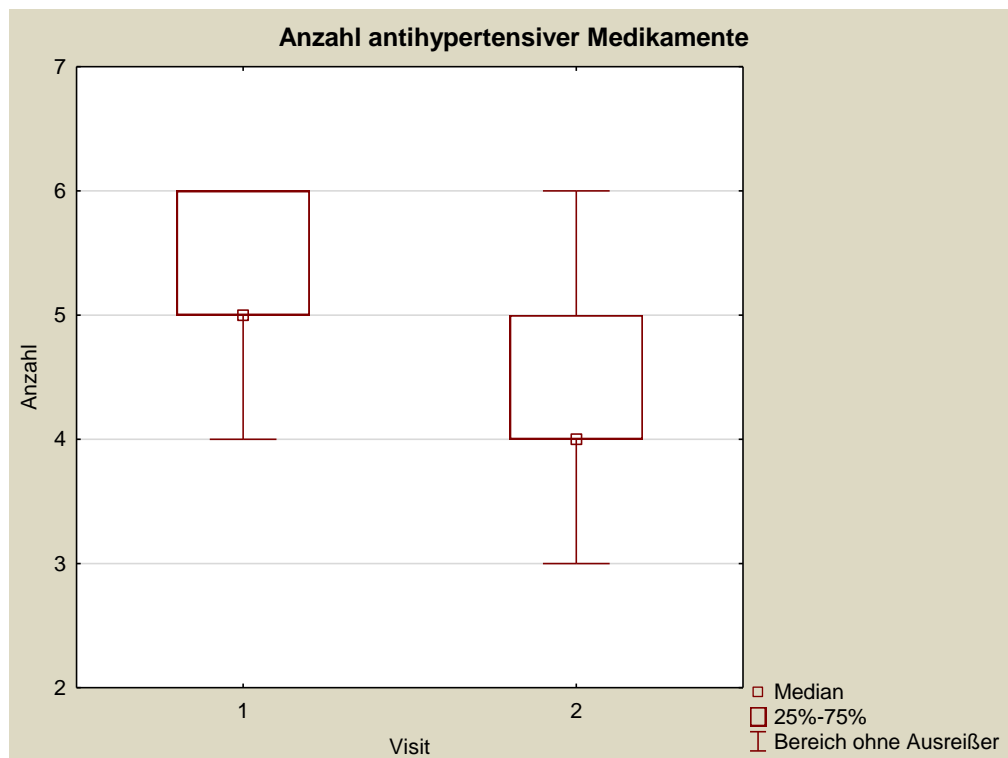
**Tabelle 5:** Demographische Daten des untersuchten Patientenkollektivs

Demographische Daten	Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung SA) oder Absolutwerte (Prozent)
Alter [a]	63,92 ( $\pm$ 11,21)
BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	31,09 ( $\pm$ 4,11)
Umfang Hüfte [cm]	111,92 ( $\pm$ 13,51)
Umfang Taille [cm]	108,92 ( $\pm$ 11,07)
	<b>Anzahl</b>
Raucher	1 (8,3 %)
Diabetes mellitus	2 (16,6 %)
Hyperlipidämie	6 (50 %)

**Tabelle 6:** Anzahl und Typ antihypertensiver Medikation vor und sechs Monate nach renaler Denervation

<b>Antihypertensive Medikation</b>	<b>Anzahl Visit I</b>		<b>Anzahl Visit II</b>	
ACE-Hemmer	5	(41,67 %)	5	(41,67 %)
AT-1 Rezeptor-Antagonisten	8	(66,67 %)	6	(50,00 %)
Beta-Blocker	11	(91,67 %)	11	(91,67 %)
Thiazide	7	(58,33 %)	6	(50,00 %)
Schleifendiuretika	6	(50,00 %)	6	(50,00 %)
Calcium-Antagonisten	8	(66,67 %)	9	(75,00 %)
Aldosteron-Antagonisten	3	(25,00 %)	3	(25,00 %)
Alphablocker	4	(33,33 %)	2	(16,67 %)
Nitrate	1	(8,33 %)	0	(0 %)
Alpha-2-Rezeptor-Antagonisten	8	(66,67 %)	5	(41,67 %)
Direkte Vasodilatoren	2	(16,67 %)	1	(8,33 %)
<b>Mittelwert *</b>	5,18 ( $\pm 0,75$ ) *		4,45 ( $\pm 0,82$ ) *	
<small>* Ausschluss einer Patientin bei schlechter medikamentöser Verträglichkeit und Einnahme von zwei Medikamenten</small>				
<b>Differenz der Anzahl antihypertensiver Medikamente Visit I zu Visit II</b>	<b>- 0,67 (<math>\pm 0,98</math>) p=0,038</b>			





**Abbildung 4:** Box-Whiskers-Plot der Anzahl antihypertensiver Medikamente vor und sechs Monate nach renaler Denervation

## 3.2 Auswertung der Blutdruckmessungen vor und nach renaler Denervation

### 3.2.1 Einzelmessungen

Die folgende Tabelle gibt die klinisch erhobenen Einzelmessungen des arteriellen Blutdrucks wieder. Es ergibt sich keine Änderung des systolischen und diastolischen Wertes (vgl. Tabelle 7). Da jedoch eine signifikante Reduktion der Anzahl antihypertensiver Medikamente stattgefunden hatte, wurde zusätzlich eine Spearman-Rangkorrelation durchgeführt. Hierbei ergab sich im Bereich der systolischen Blutdruckwerte ein Korrelationskoeffizient  $R = -0,48$  ( $p = 0,11$ ) und somit keine signifikante Korrelation. Bei der Betrachtung des diastolischen Blutdrucks hingegen, ergab sich zwischen der Reduktion der antihypertensiven Medikation und der Steigerung des diastolischen Blutdrucks eine signifikante gegensinnige Korrelation mit Spearman  $R = -0,62$  ( $p = 0,03$ ).

**Tabelle 7:** Mittelwerte des arteriellen Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung vor und sechs Monate nach renaler Denervation

<b>Arterieller Blutdruck (RR) [mmHg]</b>	<b>Visit I Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>	<b>Visit II Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>
RR systolisch	148,08 ( $\pm$ 27,67)	146,25 ( $\pm$ 16,87)
RR diastolisch	85,75 ( $\pm$ 15,69)	87,75 ( $\pm$ 13,40)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>RR systolisch: - 1,83 (<math>\pm</math>19,07)p=0,75 RR diastolisch: 2,00 (<math>\pm</math>8,15) p=0,41</b>	

### 3.2.2 24-Stunden-Blutdruckmessung

Zusätzlich wurde stets eine ambulante Aufzeichnung des Blutdrucks über 24 Stunden durchgeführt und ausgewertet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Messungen sechs Monate nach renaler Denervation. So war bei den über 24 Stunden gemittelten systolischen Werten eine tendenzielle Erhöhung um 8,58 ( $\pm$ 14,74) mmHg zu beobachten sowie um 1,58 ( $\pm$ 7,56) mmHg bei den diastolischen Werten bei jeweils fehlender Signifikanz. In der weiteren Aufschlüsselung der Aufzeichnungen zeigte sich der mittlere arterielle Druck (MAD) über 24 Stunden um 7,0 ( $\pm$ 11,52) mmHg tendenziell erhöht ( $p=0,06$ ). Während des Tages zeigte sich eine signifikante Differenz des MAD von 7,33 ( $\pm$ 10,59) mmHg mit  $p=0,04$ , in den Stunden der Nacht betrug die Differenz des MAD 3,93 ( $\pm$ 14,46) mmHg ( $p=0,37$ ) ohne Erreichen eines Signifikanzniveaus. Die gemittelten Werte des systolischen arteriellen Blutdrucks während des Tages ergaben eine nicht-signifikante Tendenz zur Erhöhung um 9,58 ( $\pm$ 15,61) mmHg ( $p=0,06$ ), während der Nacht um 6,92 ( $\pm$ 21,06) mmHg ( $p=0,28$ ) zum Zeitpunkt der Visit II. Die diastolischen Werte waren am Tag sowie in der Nacht unverändert (Tabelle 8). Die maximalen gemessenen systolischen Blutdruckwerte lagen sechs Monate nach renaler Denervation im Mittel 12,67 ( $\pm$ 26,06) mmHg höher. Maximale diastolische Werte waren ebenfalls um 12,58 ( $\pm$ 13,02) mmHg gesteigert zu verzeichnen mit  $p=0,007$ . Der minimal erhobene systolische Blutdruck war um 9,75 ( $\pm$ 11,03) mmHg ( $p=0,01$ ) erhöht. Wenn nicht gesondert erwähnt, lagen die ermittelten Differenzen über dem Signifikanzniveau von 0,05.

**Tabelle 8:** Auswertung der Langzeitblutdruckaufzeichnungen über 24 Stunden vor und sechs Monate nach renaler Denervation

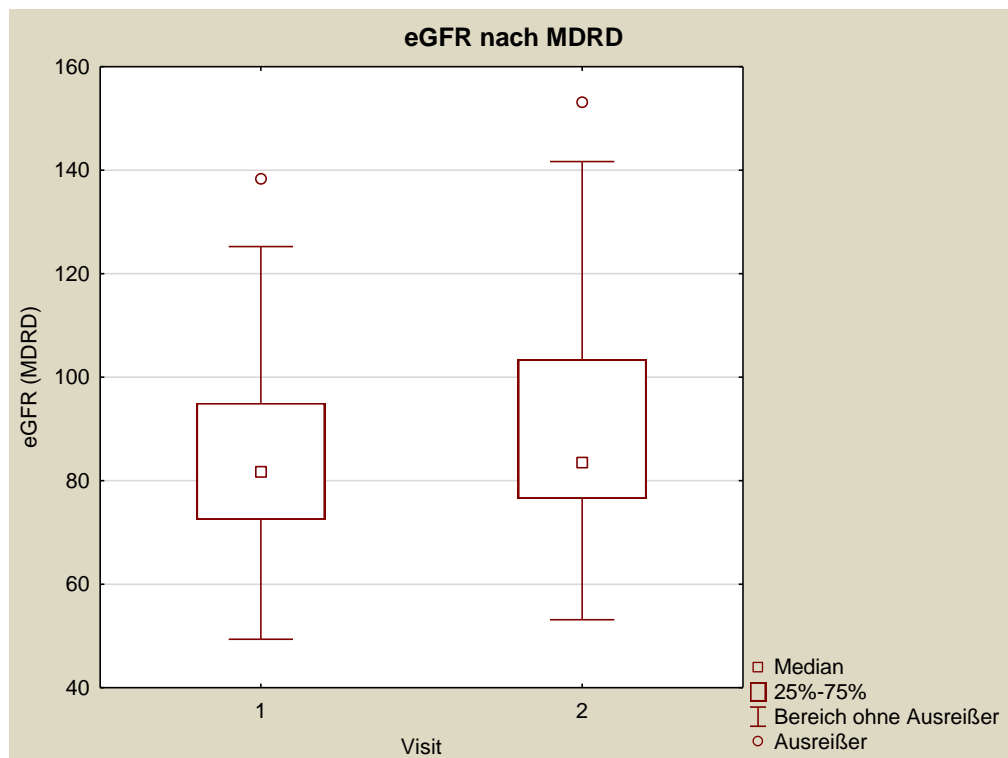
<b>Arterieller Blutdruck (RR) [mmHg]</b>	<b>Visit I Mittelwert (±SA)</b>	<b>Visit II Mittelwert (±SA)</b>
24-h RR systolisch	131,17 (±17,62)	139,75 (±18,20)
24-h RR diastolisch	75,50 (±12,25)	77,08 (±12,32)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>RR systolisch: 8,58 (±14,74) p=0,07</b> <b>RR diastolisch: 1,58 (±7,56) p=0,48</b>	
Mittlerer arterieller Druck (MAD) über 24-h	92,67 (±11,43)	99,67 (±14,61)
MAD Tag	94,33 (±11,99)	101,67 (±14,75)
MAD Nacht	88,92 (±12,75)	92,83 (±11,63)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>MAD 24-h: 7,00 (±11,52)</b>	<b>p=0,06</b>
	<b>MAD Tag: 7,33 (±10,59)</b>	<b>p=0,04</b>
	<b>MAD Nacht: 3,92 (±14,46)</b>	<b>p=0,37</b>
Tag RR systolisch	132,17 (±17,75)	141,75 (±20,68)
Tag RR diastolisch	77,33 (±13,52)	78,92 (±13,61)
Nacht RR systolisch	128,42 (±20,91)	135,33 (±18,00)
Nacht RR diastolisch	71,17 (±12,13)	70,92 (±11,92)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>Tag RR syst.: 9,58 (±15,61)</b>	<b>p=0,06</b>
	<b>Tag RR diast.: 1,58 (±9,06)</b>	<b>p=0,56</b>
	<b>Nacht RR syst: 6,92 (±21,06)</b>	<b>p=0,28</b>
	<b>Nacht RR diast: - 0,25 (±10,08)</b>	<b>p=0,93</b>

<b>Arterieller Blutdruck (RR) [mmHg]</b>	<b>Visit I Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>	<b>Visit II Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>
Max. RR systolisch	168,17 ( $\pm$ 19,06)	180,83 ( $\pm$ 22,47)
Max. RR diastolisch	97,50 ( $\pm$ 12,02)	110,08 ( $\pm$ 18,33)
Min. RR systolisch	95,75 ( $\pm$ 21,29)	105,50 ( $\pm$ 19,71)
Min. RR diastolisch	50,00 ( $\pm$ 13,02)	52,58 ( $\pm$ 13,37)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>Max. RR syst.: 12,67 (<math>\pm</math>26,06) p=0,12</b> <b>Max. RR diast.: 12,58 (<math>\pm</math>13,02) p=0,007</b> <b>Min. RR syst: 9,75 (<math>\pm</math>11,03) p=0,01</b> <b>Min. RR diast: 2,58 (<math>\pm</math>5,05) p=0,10</b>	

### 3.3 Auswertung von Laborparametern vor und nach renaler Denervation

#### 3.3.1 Beurteilung der Nierenfunktion

Die Nierenfunktion wurde mittels laborchemischer Parameter jeweils vor und nach renaler Denervation beurteilt. Hierbei ergab sich eine Tendenz zur Verbesserung der Nierenfunktion. Die berechnete glomeruläre Filtrationsrate lag bei Studienbeginn im Mittel bei 86,46 ( $\pm$ 25,40) ml/min, und zeigte sechs Monate nach renaler Denervation eine Tendenz zur Steigerung auf 91,61 ( $\pm$ 30,62) ml/min, ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. Dies entspricht einer mittleren Differenz von 5,15 ( $\pm$ 14,84) ml/min. Auf der Grundlage dieser Daten wäre zum Erreichen eines Signifikanzniveaus der Einschluss von 68 Patienten erforderlich gewesen (Berechnung mittels Poweranalyse/Statistica12.7 bei einer Teststärke von 80 %).



**Abbildung 5:** Box-Whiskers-Plot der Veränderung der berechneten glomerulären Filtrationsrate vor und sechs Monate nach renaler Denervation

Bei der Bestimmung des Kreatinins und des Cystatin C ergaben sich keine signifikanten Änderungen vor und sechs Monate nach renaler Denervation. Es gingen bei der Berechnung der Differenz des Cystatin C jedoch nur neun Patienten ein, da bei drei Patienten kein Vergleichswert vorlag.

**Tabelle 9:** Laborchemische Beurteilung der Nierenfunktion vor und sechs Monate nach renaler Denervation

	<b>Visit I</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>	<b>Visit II</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>
Berechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) [ml/min]	86,46 (±25,40)	91,61 (±30,62)
Kreatinin [mg/dl]	0,89 (±0,26)	0,86 (±0,27)
Cystatin C [mg/l]	1,11 (±0,18)	1,12 (±0,32)

**Tabelle 10 (Fortsetzung):** Laborchemische Beurteilung der Nierenfunktion vor und sechs Monate nach renaler Denervation

<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>eGFR: 5,15 (<math>\pm</math>14,84)</b>	<b>p=0,25</b>
	<b>Kreatinin: - 0,03 (<math>\pm</math>0,14)</b>	<b>p=0,52</b>
	<b>Cystatin C: 0,01 (<math>\pm</math>0,22)</b>	<b>p=0,94</b>

### 3.3.2 Laborchemische Marker einer Proteinurie

Eine laborchemische Analyse des Urins wurde bei allen Patienten vor und nach renaler Denervation durchgeführt. Die Gesamtmenge des Proteins im Urin zeigte sich unverändert, die Differenz betrug nach sechs Monaten 0,23 ( $\pm$ 133,21) mg/l. Die Bestimmung des Albumins ergab einen nicht signifikanten Trend zu einer Reduktion um -8,30 ( $\pm$ 71,28) mg/l nach sechs Monaten. Das Alpha-1-Mikroglobulin zeigte einen ebenfalls nicht signifikanten Trend zu einem leichten Anstieg um 1,99 ( $\pm$ 16,98) mg/l. Immunglobulin G wurde bei der Erstuntersuchung bei zwei Patienten detektiert und lag gemittelt bei 20,05 ( $\pm$ 12,65) mg/l. Nach sechs Monaten war Immunglobulin G bei vier Patienten nachweisbar mit Werten von 12,85 ( $\pm$ 7,41) mg/l.

Bei der Auswertung des Kreatinins im Urin ergab sich keine Änderung. Die Berechnung des Protein-Kreatinin-Quotienten blieb nahezu unverändert mit einer Differenz von 0,08 ( $\pm$ 0,24) mg/mg Kreatinin. Ähnlich war bei der Berechnung des Albumin-Kreatinin-Quotienten kein Unterschied zu ermitteln.

Die fraktionierte Natrium-Exkretion erreichte sechs Monate nach renaler Denervation keine signifikante Änderung (-0,17 ( $\pm$ 1,07) %).

Das Signifikanzniveau wurde bei keiner der Auswertungen erreicht.

**Tabelle 11:** Laborchemische Beurteilung einer Proteinurie vor und sechs Monate nach renaler Denervation

	<b>Visit I Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>	<b>Visit II Mittelwert (<math>\pm</math>SA)</b>
Protein gesamt [mg/l]	133,88 ( $\pm$ 190,50)	134,10 ( $\pm$ 111,97)
Albumin [mg/l]	50,08 ( $\pm$ 132,94) <sup>a</sup>	41,78 ( $\pm$ 72,01) <sup>a</sup>

	<b>Visit I</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>	<b>Visit II</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>
Alpha-1- Mikroglobulin [mg/l]	6,16 (±7,57) <sup>b</sup>	8,15 (±13,93) <sup>b</sup>
Immunglobulin G (Ig G) [mg/l]	20,05 (±12,65) <sup>+</sup> <sup>+ n=2</sup>	12,85 (±7,41) <sup>+</sup> <sup>+ n=4</sup>
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>Protein gesamt: 0,23 (±133,21) p=0,10</b> <b>Albumin: - 8,30 (±71,28) p=0,59 *</b> <b>Alpha-1- Mikroglobulin: 1,99 (±16,98) p=0,87 *</b> <b>Ig G: 1,03 (±8,52) p=0,18 *</b>	
Kreatinin im Urin [mg/dl]	80,99 (±61,95)	79,35 (±56,82)
Protein-Kreatinin- Quotient [mg/mg Kreatinin]	0,17 (±0,16)	0,24 (±0,30)
Albumin-Kreatinin- Quotient [mg/mg Kreatinin]	0,05 (±0,10)	0,09 (±0,18)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>Kreatinin im Urin: - 1,46 (±78,82) p=0,53 *</b> <b>Prot.-Krea.-Quotient: 0,08 (±0,24) p=0,75 *</b> <b>Albumin-Krea.-Quotient: 0,05 (±0,11) p=0,35 *</b>	
Fraktionierte Natrium- Exkretion [%]	1,07 (±0,76)	0,90 (±0,65)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>Frakt. Na.-Exkretion: - 0,17 (±1,07) p=0,64 *</b>	

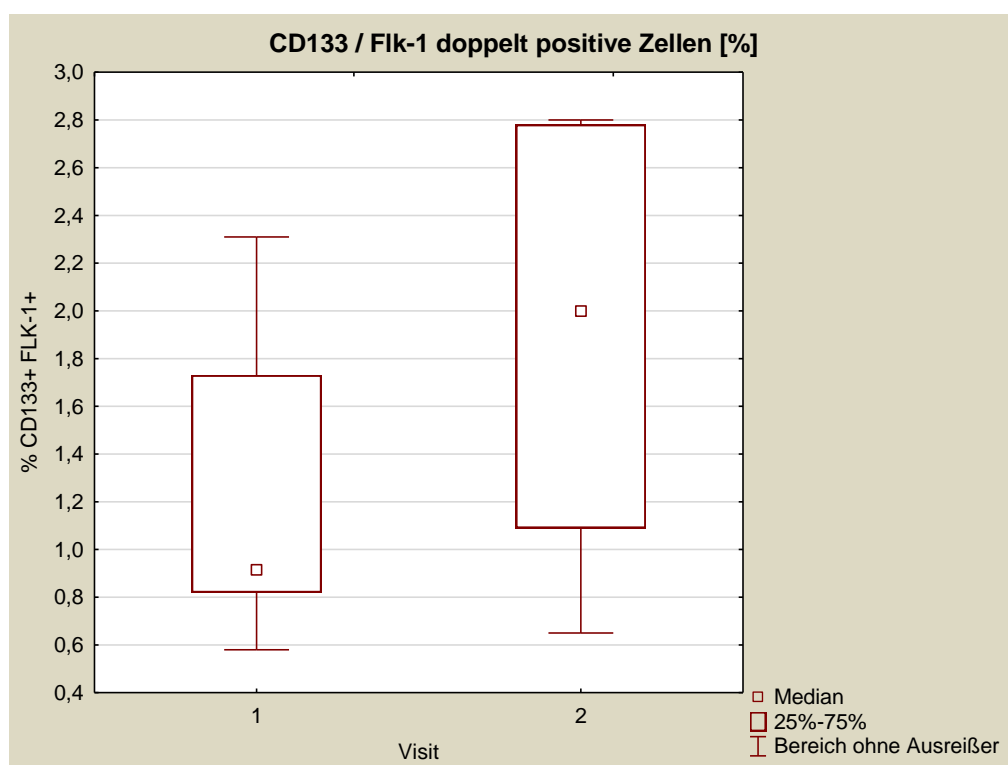
\* Berechnung mittels **Wilcoxon-Rangsummentest**

<sup>a</sup> Aufgrund der Sensitivität des Tests konnte Albumin erst ab einer Konzentration von 5 mg/l detektiert werden; Werte <5 mg/l gingen in die Berechnung mit 5 mg/l ein

<sup>b</sup> Aufgrund der Sensitivität des Tests konnte Alpha-1-Mikroglobulin erst ab einer Konzentration von 2 mg/l detektiert werden; Werte < 2 mg/l gingen in die Berechnung mit 2 mg/l ein

### 3.4 Auswertung der Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

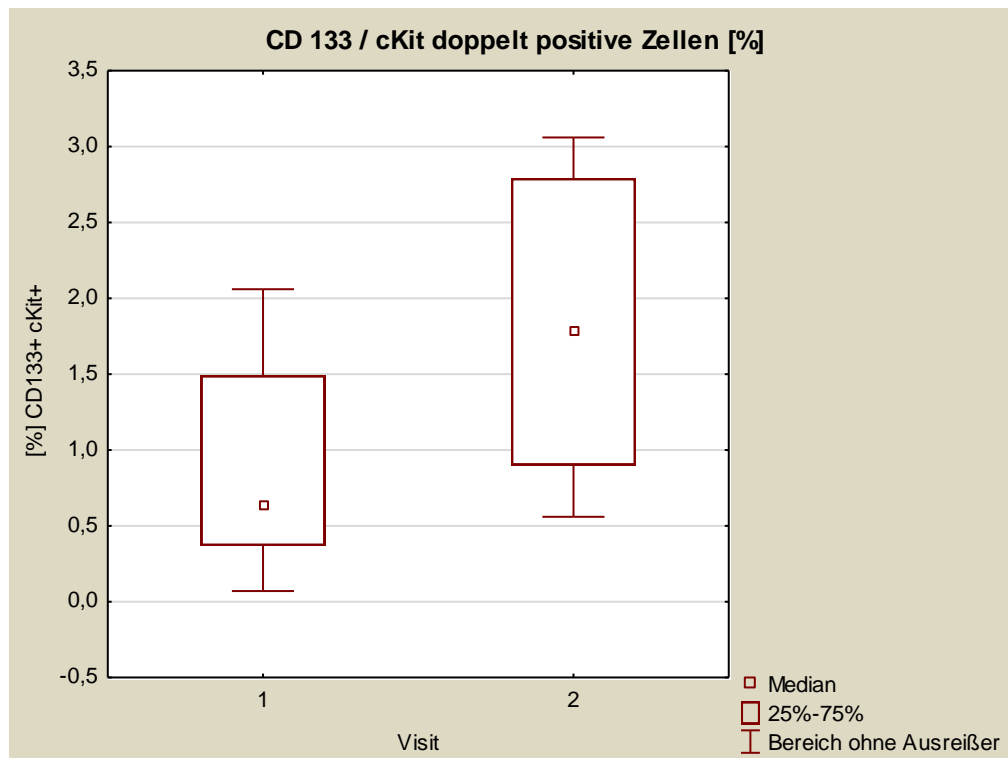
Mithilfe der Durchflusszytometrie erfolgte die Bestimmung der Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen. Sechs Monate nach renaler Denervation zeigte sich ein Trend für eine Zunahme CD133/Flk-1-doppelt positiver Zellen um 0,68 ( $\pm 1,28$ ) %, ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz ( $p=0,25$ ).



**Abbildung 6:** Box-Whiskers-Plot der Quantität endothelialer Progenitorzellen (CD133/Flk-1 doppelt positiv) vor und sechs Monate nach renaler Denervation

Sechs Monate nach renaler Denervation zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend für eine Zunahme der CD133/cKit-doppelt positiven Zellen um 0,9 ( $\pm 1,29$ ) % (bezogen auf die Gesamtzahl der mononukleären Zellen) ( $p=0,07$ ).





**Abbildung 7:** Box-Whiskers-Plot der Quantität endothelialer Progenitorzellen (CD133/cKit doppelt positiv) vor und sechs Monate nach renaler Denervation

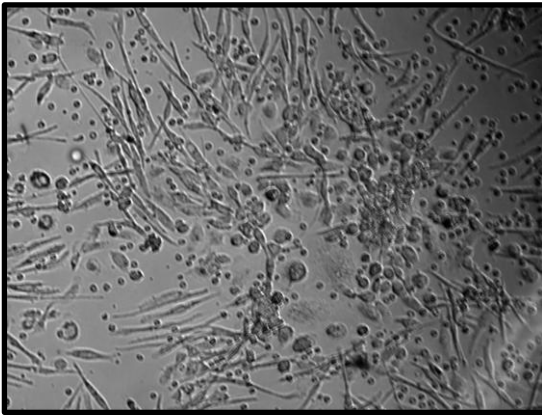
Die Ergebnisse zeigen einen Trend für eine Zunahme endothelialer Progenitorzellen nach renaler Denervation, ohne dass eine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Die FACS-Analytik konnte aufgrund der Koloniezahlen nur bei sechs von zwölf Patienten durchgeführt werden. Bei dieser geringen Patientenzahl konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten ergibt die Berechnung mittels Poweranalyse auf der Basis einer Teststärke von 80 %, dass zum Erreichen einer statistischen Signifikanz  $n=30$  bei CD133/Flk-1-doppelt positiven Zellen sowie  $n=19$  bei CD133/cKit-doppelt positiven Zellen nötig gewesen wären.

**Tabelle 12:** Auswertung der Quantität der in der Durchflusszytometrie detektierten endothelialen Progenitorzellen

	<b>Visit I</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>	<b>Visit II</b> <b>Mittelwert (±SA)</b>
CD133/Flk-1-positive Zellen [%]	1,21 (±0,67)	1,79 (±0,94)
CD133/cKit-positive Zellen [%]	0,79 (±0,70)	1,68 (±0,90)
<b>Entwicklung Visit I zu Visit II</b>	<b>CD133/Flk-1-positive Zellen [%]:</b> <b>0,68 (±1,28)                      p=0,25</b>  <b>CD133/cKit-positive Zellen [%]:</b> <b>0,90 (±1,29)                      p=0,07</b>	

### **3.5 Auswertung der Proliferationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen (EPCs) über Quantifizierung von Colony Forming Units (CFUs) in Zellkultur**

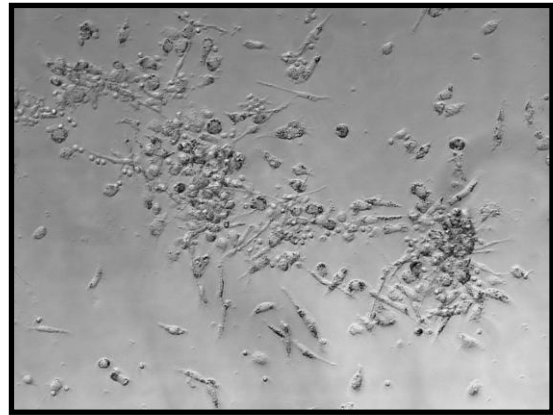
Die Proliferationsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen wurde in Zellkultur über die Quantifizierung von Zellkolonien (*colony forming units*) bestimmt.



**Abbildung 8: Zellkolonien EPCs  
(lanzettförmige Zellen)**

Pat. 004 Visit II (08.04.2014)

Vergrößerung 20x; Belichtungszeit 2000 ms  
Eigenes Bild

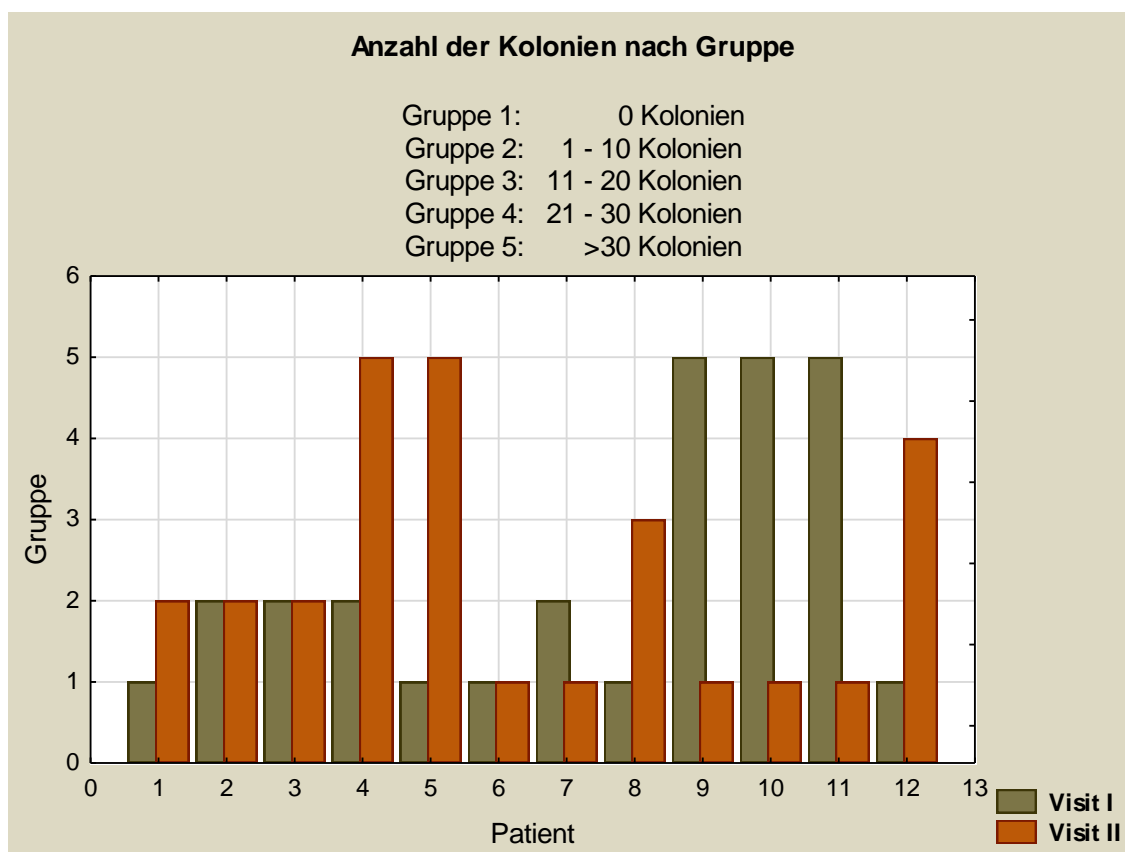


**Abbildung 9: Zellkolonien EPCs  
(lanzettförmige Zellen)**

Pat. 005 Visit II (30.07.2014)

Vergrößerung 20x; Belichtungszeit 2,87 ms  
Eigenes Bild

Es erfolgte die Zuordnung zu den Gruppen eins bis fünf entsprechend der Anzahl der Kolonien (siehe Grafik). Fünf Patienten (41,67 %) wurden bei Visit II, sechs Monate nach erfolgter renaler Denervation, einer höheren Gruppe zugeordnet, entsprechend einer Zunahme der Ausbildung von Kolonien endothelialer Progenitorzellen. Bei drei Patienten (25,00 %) ergab sich keine Veränderung der Zuordnung der Gruppe. Vier (33,33 %) Patienten wurden bei Visit II einer niedrigeren Gruppe zugeordnet.



**Abbildung 10:** Balkendiagramm nach Gruppen entsprechend der Anzahl von Kolonien EPCs in der Zellkultur vor (Visit I) und sechs Monate nach renaler Denervation (Visit II)

### 3.6 Auswertung der mittels Laserscanning-Zytometrie (iCys) bestimmten eNOS-Expression endothelialer Progenitorzellen (EPCs)

Die Bestimmung der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) erfolgte mittels Laserscanning-Zytometrie. Hierbei ergaben sich keine Änderungen des Anteils an eNOS exprimierenden Zellen von den gesamt detektierten kernhaltigen Zellen (vgl. Tabelle 12). Die weitere Analytik des Aktivitätsmarkers eNOS konnte aufgrund der Kolonienzahlen nur bei sechs von zwölf Patienten durchgeführt werden. Das Ergebnis ist nicht signifikant.



## **4. Diskussion**

### **4.1 Renale Denervation nach der SYMPLICITY HTN-3-Studie**

#### **4.1.1 Wissenschaftliche Diskussionen und Betrachtungen**

Die Publikation der Studie SYMPLICITY HTN-3 im Frühjahr 2014 (Bhatt et al. 2014), in der die primären Effektivitätseindpunkte, die Senkung des systolischen Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung sowie der ambulanten 24-h-Blutdruckmessung sechs Monate nach renaler Denervation nicht erreicht worden waren, führte zu intensiven wissenschaftlichen Diskussionen. Die Ergebnisse der SYMPLICITY HTN-3-Studie standen einer Vielzahl vorangegangener Studien gegenüber, welche eine deutliche und langanhaltende Senkung des arteriellen Blutdrucks dokumentiert hatten. Hierzu zählen unter anderem die SYMPLICITY HTN-1 (Krum et al. 2009) und SYMPLICITY HTN-2 (Simplicity HTN-2 Investigators et al. 2010) Studien. Da die hier präsentierte Studie vor dem Hintergrund des aktuellen wissenschaftlichen Konsens entworfen wurde, sind die SYMPLICITY HTN-Studien als bisher größte und repräsentativste Studien von wichtiger Bedeutung. Zum Zeitpunkt der Initiierung der hier präsentierten Studie im April 2013 galt die Effektivität der renalen Denervation bezüglich der Blutdrucksenkung als überwiegend anerkannt, sodass der Schwerpunkt unserer Studiengruppe auf der Untersuchung weiterer organoprotektiver Effekte im Zusammenhang mit der Durchführung der Intervention gelegt wurde. Das Verfehlen der primären Effektivitätseindpunkte der SYMPLICITY HTN-3-Studie sowie die nachfolgende wissenschaftliche und öffentliche Diskussion der renalen Denervation hatte auch für den Verlauf der hier beschriebenen Studie eine entscheidende Bedeutung, insbesondere bezüglich der weiteren Rekrutierung von Patienten. Es soll im folgenden daher zunächst ein Überblick über die SYMPLICITY HTN-Studien, weitere Studienhintergründe sowie aktuelle wissenschaftliche Betrachtungen, Kritikpunkte und Diskussionen gegeben werden.

##### **4.1.1.1 Überblick über die SYMPLICITY HTN-Studien**

Die folgende Tabelle stellt einen Überblick über die SYMPLICITY HTN-Studien dar, welche als größte Studien zur renalen Denervation eine zentrale Stellung in der

Forschung einnehmen. Alle Studien wurden von Medtronic mitfinanziert, dem Unternehmen welches weltweit das Kathersystem, „Symplicity™ RDN System“, zur renalen Denervation vertreibt.

**Tabelle 14:** Überblick über die SYMPPLICITY HTN-Studien

	<b>SYMPPLICITY HTN-1 (2009)</b>	<b>SYMPPLICITY HTN-2 (2010)</b>	<b>SYMPPLICITY HTN-3 (2014)</b>
<b>n</b>	45	106 Renale Denervation: n=52 Kontrollgruppe ohne Intervention: n=54	535 Renale Denervation: n=364 Nierenarteriographie: n=171
<b>Studien- design</b>	Prospektiv Offen	Prospektiv Offen Randomisiert	Prospektiv Einseitig verblindet Randomisiert Placebokontrolliert
<b>Primäre End- punkte</b>	Veränderung des Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung  Sicherheit der Intervention	Veränderung des Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung  Sicherheit der Intervention	Veränderung des Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung und ambulanten 24-h- Langzeitmessung  Sicherheit der Intervention

	<b>SYMPPLICITY HTN-1 (2009)</b>	<b>SYMPPLICITY HTN-2 (2010)</b>	<b>SYMPPLICITY HTN-3 (2014)</b>
<b>Ergebnisse nach sechs Monaten:</b>	<p><u>Reduktion des Blutdrucks:</u> <u>Einzelmessung:</u> <u>Nach RD:</u> -22 (<math>\pm</math>10) mmHg systolisch; -11 (<math>\pm</math>5) mmHg diastolisch</p> <p><b>Signifikant (p&lt;0,001)</b></p> <p>Primärer Sicherheitsendpunkt erreicht</p>	<p><u>Reduktion des Blutdrucks:</u> <u>Einzelmessung:</u> <u>Nach RD:</u> -32 (<math>\pm</math>23) mmHg systolisch; -12 (<math>\pm</math>11) mmHg diastolisch</p> <p><u>Kontrollgruppe:</u> -1 (<math>\pm</math>21) mmHg systolisch; -0 (<math>\pm</math>10) mmHg diastolisch</p> <p><b>Differenz -33/11 mmHg; Signifikant (p&lt;0,0001)</b></p> <p>Primärer Sicherheitsendpunkt erreicht</p>	<p><u>Reduktion des Blutdrucks:</u> <u>Einzelmessung:</u> <u>Nach RD:</u> -14,13 (<math>\pm</math>23,93) mmHg systolisch; -6,6 (<math>\pm</math>11,9) mmHg diastolisch</p> <p><u>Nach Nierenarteriographie:</u> -11,74 (<math>\pm</math>25,95) mmHg systolisch; -4,6 (<math>\pm</math>13,6) mmHg diastolisch</p> <p><b>Differenz -2,39 mmHg systolisch; Nicht signifikant (p=0,26)</b></p> <p><u>24-h-Messung:</u> <u>Nach RD:</u> -6,75 (<math>\pm</math>15,11) mmHg systolisch; -4,1 (<math>\pm</math>9,2) mmHg diastolisch</p> <p><u>Nach Nierenarteriographie:</u> -4,79 (<math>\pm</math>17,25) mmHg systolisch; -3,1 (<math>\pm</math>10,1) mmHg diastolisch</p> <p><b>Differenz -1,96 mmHg systolisch; nicht signifikant (p=0,98)</b></p> <p>Primärer Sicherheitsendpunkt erreicht</p>



#### 4.1.1.2 Weiterer Studienhintergrund zur renalen Denervation

Eine Vielzahl kleinerer Studien erbrachte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. So zeigte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Ott et al. eine Senkung des Blutdrucks um -13/7 mmHg ( $p < 0,001$ ) in der Einzelmessung, sowie um -14/7 mmHg ( $p < 0,001$ ) in der Langzeitblutdruckmessung über 24 h. In 51 % der 54 eingeschlossenen Patienten konnte eine Reduktion des arteriellen Blutdrucks auf Werte kleiner 140/90 mmHg erzielt werden (Ott et al. 2013). Weiterhin konnte in Follow-up-Studien eine Reduktion der Blutdruckwerte um im Mittel -28/10 mmHg ( $p < 0,001$ ) nach 12 Monaten (Esler et al. 2012) und -32/14 mmHg (systolischer Wert  $p < 0,0001$ , diastolischer Wert  $p < 0,002$ ) nach 24 Monaten verzeichnet werden (Investigators 2011). Im Jahr 2013 publizierte ein internationales Expertenkomitee in Zusammenschau bisheriger Studienergebnisse eine Stellungnahme, in der die renale Denervation, angewandt an Patienten mit therapieresistenter Hypertonie, in der Nachverfolgung über drei Jahre ein Sicherheitsprofil aufweist, welches zum Grad und der Verlässlichkeit einer Senkung des Blutdrucks als akzeptabel eingestuft wird. Weiterhin wird erläutert, dass möglicherweise ein Effekt über die Kontrolle des arteriellen Blutdrucks hinaus besteht (Schlaich et al. 2013).

In Europa und anderen Ländern wurde die renale Denervation aufgrund der vielversprechenden Datenlage an spezialisierten Zentren, so auch an der Universitätsmedizin Göttingen, zu einem von gesetzlichen Krankenkassen übernommenen Routineeingriff. In den USA hingegen war eine Zulassung durch die FDA (Food and Drug Administration) ohne vorherige Durchführung einer Sham-kontrollierten, doppel-blinden randomisierten Studie nicht möglich, sodass die Durchführung einer renalen Denervation wissenschaftlichen Studien vorbehalten blieb. Aus diesem Grund wurde die SYMPPLICITY HTN-3-Studie initiiert, welche erstmalig ein doppeltverblindetes Konzept anwandte und mithilfe einer Kontrollgruppe die Intervention auf einen möglichen Placeboeffekt untersuchte. Da weiterhin eine große Anzahl von Patienten ( $n=535$ ) eingeschlossen wurde, erfüllte die Studie hohe wissenschaftliche Ansprüche. Das Verfehlen der primären Effektivitätspunkte dieser Studie erregte entsprechend großes wissenschaftliches Interesse und Kontroversen über die Einordnung der Ergebnisse sowie den zukünftigen Umgang mit der Therapieoption einer renalen Denervation.

#### 4.1.1.3 Kritik am Design früherer Studien

Die Autoren der SYMPPLICITY HTN-3-Studie selbst beschreiben Erklärungsmodelle, wie es zu den bisherigen Publikationen entgegenstehenden Ergebnissen gekommen sein mag. Zum einen wurde in früheren Studien meist die Blutdruckentwicklung im Vergleich zu den Werten bei Studieneinschluss dokumentiert, ohne eine Kontrollgruppe zu bilden und auszuwerten. Hierbei mag das Phänomen der Regression zur Mitte einen fälschlicherweise zu hoch eingeschätzten Therapieeffekt begünstigt haben. Ebensowenig konnte der Hawthorne-Effekt ausgeschlossen werden, sodass möglicherweise bereits die Studienteilnahme zu einer verbesserten Compliance der Patienten bezüglich antihypertensiver Therapien führte. Ein weiterer entscheidender Punkt, welcher im Studiendesign ohne Verblindung und Kontrollgruppe nicht zu eruieren war, besteht in der Wirkung eines Placeboeffektes. Dieser wird zudem insbesondere durch die Invasivität der Intervention begünstigt. Somit besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Placebowirkung fälschlicherweise dem Therapieerfolg zugeschrieben wurde (Bhatt et al. 2014). Bereits vor Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie wurde entsprechende Kritik am Design der Vorläuferstudien vorgebracht. Diese bezog sich vornehmlich auf das nicht verblindete Vorgehen sowie die alleinige Erhebung klinischer Einzelmessungen des arteriellen Blutdrucks. Untersucher-, Erwartungs- und Auswertungs-Bias sind demnach mögliche Faktoren, welche die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Auch in der SYMPPLICITY HTN-2-Studie konnten die oben genannten Kritikpunkte nicht ausgeschlossen werden, da kein standardisiertes antihypertensives Therapiekonzept angewandt wurde, die Compliance bezüglich der medikamentösen Therapie nicht überprüft wurde und keine verblindeten Messungen erhoben wurden. Zudem wussten Patienten der Kontrollgruppe, dass ihnen die Behandlung der renalen Denervation nur dann zuteil werden würde, wenn ihre Blutdruckwerte weiterhin hoch blieben, weshalb diese Patienten möglicherweise eine verminderte Compliance bezüglich ihrer Medikation und Lebensstilveränderungen aufwiesen. Während in der Gruppe nach erfolgter renaler Denervation ein gegenteiliger Effekt denkbar ist, wobei durch hohe Erwartungen an die neue und vielversprechende Intervention sowie durch den Hawthorne-Effekt eine verbesserte Compliance zur verzeichneten Reduktion des arteriellen Blutdrucks beitragen (Azizi et al. 2012). Kritiker der renalen Denervation sahen sich nach der Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie darin bestätigt, dass der echte therapeutische Effekt der renalen Denervation aufgrund all dieser Faktoren

und Mängel im Studiendesign deutlich überschätzt worden war (Fadl Elmula et al. 2015). Dies scheint sich auch in der Differenz der erzielten Blutdrucksenkung im Vergleich der klinischen Einzelmessung mit der ambulanten 24-h-Messung wiederzuspiegeln. Die ambulante 24-h-Langzeitmessung des Blutdrucks reduziert die Untersucher-Bias, Messfehler, den Weißkitteleffekt, und weist eine höhere Reproduzierbarkeit auf (Fadl Elmula et al. 2015). Eine später durchgeführte Metaanalyse, welche Blutdruckwerte von Patienten nach renaler Denervation aus zehn europäischen Zentren auswertete, beschrieb eine deutlich stärker ausgeprägte Senkung des arteriellen Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung (-17,6/7,1 mmHg;  $p \leq 0,03$ ) im Vergleich zur 24-h-Langzeitmessung (-5,9/3,5 mmHg;  $p \leq 0,03$ ). Weiterhin wurde eine deutliche interindividuelle Varianz des Ansprechens auf die Intervention beschrieben, und zum Teil auch eine Steigerung des Blutdrucks verzeichnet (Persu et al. 2014).

#### 4.1.1.4 Kritik an der SYMPPLICITY HTN-3-Studie

Die Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie eröffnete viele wissenschaftliche Diskussions- und Ansatzpunkte, welche eine Verstärkung von Dringlichkeit und Interesse erfuhren. Eine Entwicklung, welche zweifelsohne im Interesse von Patienten ist.

Obwohl das Studiendesign der SYMPPLICITY HTN-3-Studie im Vergleich mit vorangegangenen Studien die bisher höchsten wissenschaftlichen Kriterien erfüllt, ergeben sich in spezifischen Analysen auch hier Kritikpunkte, welche in der Beurteilung der Ergebnisse zu berücksichtigen sind.

##### 4.1.1.4.1 Konsistenz im medikamentösen Therapieregime, Monitoring und Besonderheiten von Subgruppen

Änderungen der pharmakologischen antihypertensiven Therapie der in die Studie eingeschlossenen Patienten waren laut dem Studienprotokoll in zwei Wochen vor dem endgültigem Studieneinschluss und Randomisierung nicht erlaubt. Patienten wurden angewiesen ein Tagebuch über Blutdruckwerte und Medikamenteneinnahme zu führen. Da jedoch aus vielen Studien bekannt ist, dass der maximale therapeutische Effekt vieler Antihypertensiva erst nach acht Wochen erreicht wird, nachdem Änderungen der

Dosierung vorgenommen oder neue Medikamente kombiniert wurden, ist es möglich, dass viele Patienten bei Studieneinschluss noch keine adäquate Stabilisierung ihres Therapieregimes erfahren hatten. Diese Hypothese wird insbesondere auch durch die deutliche Reduktion der Blutdruckwerte in der scheinbehandelten Kontrollgruppe bestärkt (Lüscher und Mahfoud 2014). Weiterhin wurden bei 39 % der Patienten im Zeitraum zwischen Studieneinschluss und Erhebung der primären Endpunkte nach sechs Monaten Änderungen der Dosierung oder Medikamentenklasse vorgenommen (Kandzari et al. 2015). Ein objektives Messverfahren zur Ermittlung der Compliance bezüglich der pharmakologischen Therapie, z. B. über Bestimmung der Urinmetabolite, war im Studiendesign nicht vorgesehen. Es fanden jedoch acht Arzt-Patienten-Kontakte im Verlauf der Studie statt, sodass möglicherweise auch hier der Hawthorne-Effekt zum Tragen kam, und die Compliance der Patienten bezüglich der Medikamenteneinnahme hierdurch verstärkt wurde (Lobo et al. 2015).

Subgruppenanalysen ergaben außerdem eine Besonderheit in der Medikation mit direkten Vasodilatoren. Diese erwiesen sich als negativer prädiktiver Faktor in Bezug auf eine Senkung des arteriellen Blutdrucks nach sechs Monaten (Kandzari et al. 2015). 26,2 % der in die Studie eingeschlossenen Patienten waren Afroamerikaner, und es zeigte sich, dass diese präferenziell mit direkten Vasodilatoren therapiert wurden. In der Kontrollgruppe erhielten 56 % der Afroamerikaner, und 40,5 % der weißen Amerikaner Vasodilatoren, während in der renal denervierten Gruppe 46,7 % der Afroamerikaner und 33,7 % der weißen Amerikaner Vasodilatoren einnahmen. Genauere Analysen hierzu ergaben, dass in der Kontrollgruppe Afroamerikaner unter Medikation mit direkten Vasodilatoren eine deutlich größere Reduktion des arteriellen Blutdrucks erfuhren ( $-21,9 \pm 29,1$  mmHg) als Afroamerikaner ohne Vasodilatoren oder weiße Amerikaner, unabhängig davon, ob sie Vasodilatoren einnahmen oder nicht. In der Gruppe renal denervierter Patienten ergab sich bei weißen Amerikanern ohne Therapie mit Vasodilatoren eine signifikant größere Senkung des Blutdrucks in der klinischen Einzelmessung nach renaler Denervation ( $-17,6$  mmHg) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $-10,4$  mmHg;  $p=0,03$ ). In der 24-h-Langzeitmessung ergab sich ein gleichsinniger Trend, erreichte jedoch keine Signifikanz (Kandzari et al. 2015). Schlussfolgernd aus ebensolchen Analysen muss im Design nachfolgender Studien die Möglichkeit unterschiedlichen therapeutischen Ansprechens auf pharmakologische

Therapien und die renale Denervation entsprechend der Zugehörigkeit verschiedener Ethnien berücksichtigt werden.

Weitere statistische Post-hoc-Analysen ergaben eine Medikation mit Aldosteronantagonisten als positivem prädiktivem Faktor zur Reduktion des Blutdrucks nach sechs Monaten, sowohl in der klinischen Einzelmessung, als auch in der ambulanten 24-h-Aufzeichnung (Kandzari et al. 2015).

#### 4.1.1.4.2 Durchführung der renalen Denervation

Ein weiterer Kritikpunkt an der SYMPPLICITY HTN-3-Studie betrifft die Ausführung der renalen Denervation. Bemerkenswert hierbei ist, dass die in die Studie eingeschlossenen 535 Patienten an 88 Zentren rekrutiert worden waren. Die insgesamt 364 renalen Denervationen wurden von 111 Interventionalisten durchgeführt. Von diesen führten 34 % nicht mehr als eine Intervention durch, und lediglich 26 Interventionalisten kam die Ausführung von mehr als fünf renalen Denervationen zu (Lobo et al. 2015). Da in den USA die renale Denervation noch nicht als Routineeingriff etabliert war, ist anzunehmen, dass ohne vorherige Erfahrungen die Lernkurve der ausführenden Interventionalisten einen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse hatte. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da bisher kein Test zur Verfügung steht, welcher den Nachweis adäquaten Kontakts zur Arterienwand sowie eine effektive Zerstörung renaler Nerven erlaubt (Lüscher und Mahfoud 2014).

In statistischen Post-hoc-Kohortenanalysen der SYMPPLICITY HTN-3-Studie zeigte sich zudem, dass das Setzen von Ablationspunkten in allen vier Quadranten beider Nierenarterien mit einer größeren Reduktion des systolischen Blutdrucks in Verbindung steht, sowohl in der klinischen Messung (-24,3 mmHg) als auch in der ambulanten Messung (-10,3 mmHg). Jedoch wurde eine solche Durchführung nur bei 19 von 364 renal denervierten Patienten protokolliert. Weiterhin zeigte sich, dass auch die Anzahl der Ablationspunkte mit dem Ausmaß der Senkung des Blutdrucks korreliert. In 40 Patienten mit mehr als 13 Ablationsversuchen zeigte sich eine Reduktion des systolischen Blutdrucks in der ambulanten Messung um -10,3 mmHg. Dies entspricht der im „Global Symplicity Registry“ verzeichneten Effektivität, bei entsprechender Anzahl von Ablationspunkten. Durchschnittlich wurden während der SYMPPLICITY

HTN-3-Studie jedoch nur  $11,2 \pm 2,8$  Ablationsversuche unternommen, und  $9,2 \pm 2,0$  Ablationspunkte protokolliert (Lobo et al. 2015).

#### **4.1.2 Auswirkungen der Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie auf die vorliegende Studie**

Die hier präsentierte Studie wurde im April 2013 initiiert und von der örtlichen Ethikkommission anerkannt. Bis zur Publikation der SYMPPLICITY HTN-3-Studie im Frühjahr 2014 waren acht Patienten bereits in die Studie eingeschlossen worden. Da diese wie bereits beschrieben, zu großen wissenschaftlichen und auch öffentlichen Diskussionen führte, galt es selbstverständlich auch für unsere Studiengruppe den für Patienten bestmöglichen Umgang mit den Studienergebnissen zu eruieren. In einer Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. zur SYMPPLICITY HTN-3-Studie empfahl diese, die Durchführung der renalen Denervation auf ausgewiesene Zentren zu beschränken, sowie möglichst den Einschluss der Patienten in ein Register oder Studien anzustreben (Böhm 2014). Da diese Empfehlungen der im Rahmen der an der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführten Studie entsprachen, die primären Sicherheitsendpunkte der SYMPPLICITY HTN-3-Studie eindeutig erreicht worden waren, vorangegangene Studien hoher wissenschaftlicher Qualität für das Verfahren der renalen Denervation sprachen und eine standardisierte sorgfältige klinische Untersuchung der Patienten auf deren Eignung zur renalen Denervation im Studiendesign verankert war, wurde die Studie fortgeführt. Alle im Folgenden eingeschlossenen Patienten wurden jedoch sorgfältig über das Verfahren sowie die Ergebnisse der SYMPPLICITY HTN-3-Studie aufgeklärt. Da bis zum Erzielen weiterer differenzierter wissenschaftlicher Erkenntnisse bezüglich der Effektivität der renalen Denervation jedoch eine gewisse Zurückhaltung in der Anwendung des Verfahrens sowohl von den Patienten als auch von den behandelnden Ärzten angezeigt war, konnten nur deutlich weniger Patienten in die Studie eingeschlossen werden als ursprünglich angestrebt. Schwierigkeiten ergaben sich weiterhin dadurch, dass die Finanzierung der Prozedur durch die Kostenträger durch die Ergebnisse der SYMPPLICITY HTN-3-Studie beeinflusst wurde. Die fehlende Kostenübernahme schränkte die Rekrutierung zusätzlich ein. Die endgültige Zahl der Studienteilnehmer belief sich schließlich auf zwölf Patienten, im Vergleich zu der ursprünglich kalkulierten Anzahl von 30 Patienten. Hierdurch resultierte eine geringe

Power der statistischen Analysen, so dass die im Vorfeld definierten Endpunkte zum Erfassen potentieller organoprotektiver Effekte verfehlt wurden. Dennoch ergaben sich aus der Verknüpfung der experimentellen Fragestellung mit der klinischen Studie einige interessante Entwicklungen, insbesondere bezüglich der Anzahl endothelialer Progenitorzellen (EPCs) sowie der Nierenfunktion, die Grundlage für weitere wissenschaftliche Arbeiten darstellen könnte. Von besonderem Interesse für die Evaluation von potentiell vasoprotektiven Effekten durch die renale Denervation ist dabei die Analyse von endothelialen Progenitorzellen. Bei Bestimmung der Oberflächenmarker CD133/Flk-1 ergab sich eine tendenzielle Zunahme der Anzahl EPCs um 0,68 ( $\pm 1,28$ ) % mit  $p=0,25$  nach sechs Monaten. Um hier das Signifikanzniveau zu erreichen, wäre, laut Berechnung mittels einer Poweranalyse, die Auswertung von Daten von 30 Patienten nötig gewesen. Die Kreuzkontrolle mit Bestimmung der Oberflächenmarkerkombination CD133/cKit ergab eine tendenzielle Steigerung der Zahl EPCs um 0,90 ( $\pm 1,29$ ) % mit  $p=0,07$ . Auf der Basis einer Power Analyse mit einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer statischen Power von 80 % wäre das Signifikanzniveau bei Einschluss von 19 Patienten erreicht worden. Auch bei der Entwicklung der eGFR ließ sich eine tendenzielle Steigerung um 5,15 ( $\pm 14,84$ ) ml/min dokumentieren ( $p=0,25$ ). Zum Erreichen einer statischen Signifikanz hätte auf dem Boden dieser Daten bei einem Signifikanzniveau von 0,05 sowie einer statischen Power von 80 % ein Kollektiv von 68 Patienten rekrutiert werden müssen. Trotz fehlendem Effektivitätsnachweis der renalen Denervation auf die untersuchten Variablen bei sehr kleiner Fallzahl, liefert die vorliegende Studie innovative Ansatzpunkte, um reno- und vaskuloprotektiver Effekte der renalen Denervation zu untersuchen.

## **4.2 Interpretation und Einordnung der Ergebnisse**

### **4.2.1 Entwicklung des arteriellen Blutdrucks**

Die Entwicklung des arteriellen Blutdrucks muss in Zusammenschau mit der Einnahme antihypertensiver Medikamente betrachtet werden. Hier ist auffällig, dass bei 50 % der Patienten eine Reduktion der Anzahl der Medikamente nach renaler Denervation erfolgt war. Dies war ausdrücklich nicht die Intention der Studie beziehungsweise der

Intervention, jedoch war bei klinischer Notwendigkeit eine Anpassung der Medikation zulässig. Der Mittelwert der Anzahl antihypertensiver Medikamente betrug bei Studienbeginn 5,18 ( $\pm 0,75$ ), und lag sechs Monate nach renaler Denervation bei 4,45 ( $\pm 0,82$ ). Die Differenz von -0,67 ( $\pm 0,98$ ) erreichte mit  $p=0,038$  statistische Signifikanz. Möglicherweise wurde hierdurch einem potentiellen Effekt der renalen Denervation entgegengewirkt, so dass tendenziell angestiegene Blutdruckwerte sechs Monate nach renaler Denervation dokumentiert wurden. Hier ergab sich statistisch eine signifikante gegensinnige Spearman-Korrelation zwischen dem Anstieg des diastolischen Blutdrucks und der Reduktion der Antihypertensiva ( $R = -0,62$ ;  $p = 0,03$ ). Dies vermag die Hypothese einer Beeinflussung der Studienergebnisse durch verfrühte Umstellung der blutdrucksenkenden Medikation zu stützen. Ebenso war in der ambulanten 24-h-Langzeitblutdruckmessung keine Änderung der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte festgestellt worden. Auffällig jedoch ist die ausgebliebene Absenkung des arteriellen Blutdrucks in jedem Fall dahingehend, dass offensichtlich abgesehen von der Effektivität des Verfahrens an sich, auch Effekte wie der Placebo- und Hawthorneffekt nicht in ebensolchem Maße zum Tragen kamen wie in anderen Studien beschrieben. Dies ist gegebenenfalls tatsächlich als Hinweis einer Verschleierung der blutdrucksenkenden Effekte durch eine zu frühe Reduktion antihypertensiver Medikamente zu werten. Alle Patienten waren zwar darüber aufgeklärt worden, dass Veränderungen der Medikation nicht Ziel der Intervention seien, jedoch besteht bei vielen Patienten ein dringlicher Wunsch, weniger Medikamente einzunehmen. Zudem ist es möglich, dass bei häuslichen Selbstmessungen der Patienten fälschlicherweise niedrigere Werte dokumentiert wurden, sodass sich betreuende Hausärzte veranlasst sahen eine Reduktion der Antihypertensiva durchzuführen. Eine Rücksprache mit unserer Studienambulanz erfolgte hierbei nicht. Um den Grad der Adhärenz bei den Patienten abzuschätzen, sollten Adhärenzmessungen bei der Durchführung von Folgestudien implementiert werden.

#### **4.2.2 Renoprotektive Effekte**

Die Nieren sind ein im besonderem Maße an der sympathischen Überaktivität sowohl beteiligtes wie auch betroffenes Organ. Da die arterielle Hypertonie mit einer erhöhten Natriumretention einhergeht, kommt es zur Überaktivität des efferenten sympathischen



Nervensystems (Kopp 2015). Zusätzlich führt eine Schädigung der Nieren, wie sie bei Hypertonikern häufig vorliegt, zu einer Umkehr der inhibitorischen renalen Reflexe zu exzitatorischen Signalen. Hieraus resultiert eine weitere Verstärkung der sympathischen Überaktivität und eine zusätzlich vermehrte Natriumretention und Steigerung des arteriellen Blutdrucks (Kopp 2015). Da eine renale Denervation an dem sympathischen Nervengeflecht um die Nierenarterien interveniert und somit den Versuch repräsentiert, den sich entwickelnden Circulos vitiosus zu durchbrechen, liegt es nahe, dass rückwirkend eine Verbesserung im Natrium- und Wasserhaushalt, hierdurch eine verbesserte Regulation des Blutdrucks und somit auch ein Fortschreiten einer Nephrosklerose vermindert werden kann bzw. es sogar zu einer Verbesserung der Nierenfunktion kommen könnte. Mit der vorliegenden Studie wurden klinische, laborchemische und experimentelle Parameter eruiert, welche zur Überprüfung einer solchen Hypothese dienlich sein sollen. Das Fortschreiten der histologisch erkennbaren Nephrosklerose resultiert in einer Reduktion der berechneten glomerulären Filtrationsrate (eGFR). Da in der prospektiv klinischen Studie die histologische Untersuchung aus ethischen Gründen nicht möglich war, wurde zur Beurteilung der Nierenfunktion, wie im klinischen Alltag üblich, die eGFR herangezogen. Sechs Monate nach renaler Denervation war ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen gewesen. Weiterhin erfolgte, wie ebenfalls klinisch üblich, die Bestimmung des Kreatinins. Auch hier wurde eine leichte, jedoch in dieser Studie ebenfalls nicht signifikante Reduktion ermittelt. Als zusätzlicher Kontrollparameter wurde außerdem das sensitivere und von anderen Faktoren wie Muskelmasse oder Ernährung unabhängige und möglicherweise für ältere Patienten besser geeignete Cystatin C bestimmt (Fan et al. 2015). Der Referenzbereich wird vom Zentrallabor der Universitätsmedizin mit 0,4 – 0,99 mg/l angegeben ([http://www.clinchem.med.uni-goettingen.de/media/projekt/Hinweisheft\\_20151015.pdf](http://www.clinchem.med.uni-goettingen.de/media/projekt/Hinweisheft_20151015.pdf). (02.03.2017)). Bei Studieneinschluss lag der mittlere Wert des Cystatin C mit 1,11 ( $\pm 0,18$ ) mg/l somit über diesem Referenzbereich. Sechs Monate nach renaler Denervation war dieser um 0,01 ( $\pm 0,22$ ) mg/l angestiegen auf 1,12 ( $\pm 0,32$ ) mg/l ( $p=0,94$ ). Da jedoch nur bei neun Patienten ein Vergleichswert vorlag und die Differenz sehr klein ist, lässt sich aus diesem Ergebnis kein Rückschluss auf eine mögliche Veränderung ziehen. Generell bleibt zu diskutieren, ob die erzielten Ergebnisse durch die fehlende postinterventionelle Absenkung des Blutdrucks beeinflusst sind und hierdurch andernfalls womöglich deutlichere positive Effekte abgeschwächt wurden. Andererseits ist aufgrund der

trotzdem verzeichneten tendenziellen Veränderungen die Hypothese zu prüfen, ob eine Verbesserung der Nierenfunktion nach renaler Denervation unabhängig von der erzielten Reduktion des arteriellen Blutdrucks eintritt. Um eine wissenschaftliche Evidenz zu erlangen, ist eine größere Anzahl an Studienteilnehmern sowie eine längere Nachverfolgung unabdingbar. Jedoch beobachtete die Arbeitsgruppe um Kiuchi et al. über 24 Monate nach erfolgter renaler Denervation bei insgesamt 30 Patienten einen signifikanten Abfall des Serumkreatinins im Vergleich zum Ausgangswert sowie gleichsinnig einen signifikanten Anstieg der eGFR. Diese stieg von initial 61,9 ( $\pm$  23,9) ml/min auf 88,0 ( $\pm$  39,8) ml/min nach 24 Monaten ( $p < 0,0001$ ), was eine Verbesserung um 42 % bedeutet. In dieser Studie war es ebenfalls zu einer signifikanten Senkung des Blutdrucks sowohl in der Einzelmessung als auch in der 24-h-Aufzeichnung gekommen (Kiuchi et al. 2016). Eine weitere Studie mit 27 Patienten beschreibt eine Umkehr der generellen Entwicklung der eGFR. Vor renaler Denervation war es zu einer jährlichen Verschlechterung um durchschnittlich -4,8 ( $\pm$  3,8) ml/min gekommen, während 12 Monate nach der Intervention eine Verbesserung um 1,5 ( $\pm$  10) ml/min verzeichnet wurde ( $p = 0,009$ ) (Ott et al. 2015). Des Weiteren schließen Hering et al. aus ihren Beobachtungen von 46 Patienten über 24 Monate, dass die renale Denervation das Fortschreiten einer Verschlechterung der Nierenfunktion verlangsamt, unabhängig von der Blutdrucksenkung (Hering et al. 2016). Entsprechend der statistischen Poweranalyse wäre in der hier beschriebenen Studie zum Erreichen des Signifikanzniveaus der Veränderung der eGFR ein Kollektiv von 68 Patienten nötig gewesen, also eine etwas größere Anzahl als in den beschriebenen Studien. Dies mag auf die geringe statistische Aussagekraft der limitierten Daten zurückzuführen sein bzw. darauf, dass der Nachverfolgungszeitraum kürzer angesetzt war oder möglicherweise tatsächlich geringere Veränderungen auftraten.

Unverzichtbar bei der Beurteilung eines glomerulären oder tubulären Schadens ist außerdem die Differenzierung einer Proteinurie. Die Gesamtmenge der detektierten Proteine im Urin war sechs Monate nach renaler Denervation unverändert. Auffällig in der Betrachtung der Verläufe einzelner Patienten ist hierbei jedoch, dass Patienten mit hohen Werten einer Proteinurie im Studienverlauf häufig eine Verbesserung der Proteinurie erfuhren. Hieraus lässt sich vermuten, dass die Durchführung einer renalen Denervation keinen negativen Effekt auf den Verlauf einer Proteinurie hat. Zur abschließenden Beurteilung wäre eine deutlich größere Fallzahl notwendig. Bei

Betrachtung der Studie von Wallbach et al., welche Patienten nach Erhalt eines weiteren sympathikoinhibitorischen Verfahrens, der Barorezeptoren-Stimulationstherapie untersuchte, ließ sich eine signifikante Senkung der Proteinurie beobachten (Wallbach et al. 2014), so dass auch ein möglicher therapeutischer Effekt im Rahmen der renalen Denervation diskutiert werden könnte.

Das Hauptmarkerprotein einer glomerulären Schädigung des Nierenparenchyms, das Albumin, lag bei Studienbeginn im Mittel bei 50,08 ( $\pm 132,94$ ) mg/l. Sechs Monate nach renaler Denervation lag dieser Wert bei 41,78 ( $\pm 72,01$ ) mg/l ( $p=0,59$ ). Bei fehlender Signifikanz lässt sich auch hier keine direkte Schlussfolgerung bezüglich eines therapeutischen Nutzens ziehen. Die erzielte Reduktion der Albuminurie bleibt jedoch ein interessanter Aspekt, der in nachfolgenden Studien weiter eruiert werden sollte.

Bei der Berechnung der Quotienten Protein zu Kreatinin sowie Albumin zu Kreatinin im Urin ergaben sich keine Veränderungen im Verlauf der Studie. Zu bemerken ist jedoch, dass aktuelle Studien signifikante Verbesserungen des Albumin-Kreatinin-Quotienten nach renaler Denervation verzeichnen konnten. So beschreiben Sousa et al. in einer Studie mit 31 Patienten eine durchschnittliche Verbesserung des Albumin-Kreatinin-Quotienten von 25,8 (9,0-574,0) mg/g zu 14,8 (4,5-61,0) mg/g nach zwölf Monaten ( $p=0,007$ ). Die Veränderungen des Quotienten waren zudem unabhängig davon, ob es sich um sogenannte Responder oder Non-Responder bezüglich einer Verbesserung des Blutdruckniveaus handelte (Sousa et al. 2017). Ähnlich beobachteten Kiuchi et al. bei 30 Patienten über 24 Monate eine Verbesserung von 99,8 (38,0-192,1) mg/g zu 11,0 (4,1-28,1) mg/g, was einer graduellen Reduktion über diesen Zeitraum um 87 % entspricht (Kiuchi et al. 2016). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutsamkeit der Ausrichtung weiterer Studien auf die Eruierung organoprotektiver Effekte der renalen Denervation sowie einer langen Nachverfolgungszeit der Patienten.

Ob die fraktionierte Natriumexkretion, welche auf Grundlage der Kawasaki-Formel in unserer Studie ebenfalls berechnet wurde und keine signifikante Änderung zeigte, im Verlauf größerer Studien mit höherer statistischer Power zu einer signifikanten Änderung führt, sollte in weiteren Forschungsanstrebungen berücksichtigt werden.

### 4.2.3 Vaskuloprotektive Effekte

Patienten mit langjähriger arterieller Hypertonie sind insbesondere gefährdet durch die Entwicklung von Endorganschäden welche durch vaskuläre Defekte hervorgerufen werden. Therapieresistente Hypertoniker sind somit einem besonderen Risiko ausgesetzt von einer Vielzahl kardialer, renaler, vaskulärer und zerebrovaskulärer Erkrankungen betroffen zu sein, und somit auch einem höheren Risiko von Morbidität und Mortalität. Aus diesem Grund ist es von speziellem Interesse, ob eine interventionelle Maßnahme wie die renale Denervation, es vermag, positiv auf ebendiese Aspekte einzuwirken. Die Untersuchung endothelialer Progenitorzellen (EPCs) auf deren Quantität, Proliferationsfähigkeit und Funktionalität erlaubt es, Rückschlüsse, auf das kardiovaskuläre Risiko, die Wahrscheinlichkeit des Fortschreitens artherosklerotischer Prozesse, den Gefäßstatus sowie die endogene Fähigkeit zur Reparatur endothelialer Gefäßschäden zu ziehen (Perticone et al. 2001, Schmidt-Lucke 2005, Asahara et al. 1999).

Prinzipiell zeigten Studien, wie die der Arbeitsgruppe um Hill et al., dass eine bestehende arterielle Hypertonie mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Kolonien EPCs einhergeht ( $p=0,04$ ) (Hill et al. 2003). Ebenso wie die von Vasa et al. publizierte Studie Bluthochdruck als den individuellen Risikofaktor beschreibt, welcher am stärksten die Migrationsfähigkeit von EPCs reduziert (Vasa et al. 2001). Entsprechend ist rückschließend zu erwarten, dass eine Blutdruckabsenkung zu einer Milderung dieser Effekte und somit zu einer Verbesserung des individuellen kardiovaskulären Risikos führt.

In der FACS-Analyse wurden typische Oberflächenmarker endothelialer Progenitorzellen mittels Antikörperfärbung bestimmt. Über die Kombinationen von CD133 mit sowohl Flk-1 als auch cKit konnte zudem eine doppelte Kontrollmöglichkeit generiert werden, da bekannt ist, dass nahezu alle Zellen, welche Flk-1 exprimieren eine Coexpression von cKit aufweisen (Hibbert et al. 2011). In der Auswertung zeigten sich sechs Monate nach renaler Denervation CD133/Flk-1-positive Zellen und CD133/cKit-positive Zellen ohne signifikante Änderung, jedoch mit einer tendenziellen Zunahme. Der gleichsinnig ermittelte Trend zur Steigerung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen vermag jedoch möglicherweise als Hinweis auf einen positiven Einfluss der renalen Denervation interpretiert werden. Dies sollte in Studien eines

größeren Patientenkollektivs mit längerer Nachverfolgungszeit überprüft werden. Die Proliferationsfähigkeit der EPCs wurde in Zellkultur über die Ausbildung von Zellkolonien (colony forming units – CFUs) ermittelt. Bei 41,67 % der Patienten konnte sechs Monate nach erfolgter renaler Denervation eine größere Anzahl an Kolonien gezählt werden. 25 % der Patienten zeigten keine deutlichen Veränderungen, und bei 33,33 % der Patienten bildeten sich weniger CFUs. Ob sich ein Trend zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit und somit Ausbildung von CFUs bei der Erfassung einer größeren Anzahl von Patienten sowie gegebenenfalls längerer Nachverfolgung verstärken würde, bleibt zu überprüfen.

Die endothelialen Progenitorzellen wurden des Weiteren mittels Laserscanning-Zytometrie (iCYS) bezüglich ihrer Funktionalität untersucht. Die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) auf der Oberfläche der EPCs lässt Rückschlüsse auf deren Beitrag zur Gefäßhomöostase zu. Bereits seit längerem ist bekannt, dass bei Patienten mit essentieller Hypertonie die Freisetzung von Stickstoffmonoxid herabgesetzt ist (Panza et al. 1993). In der präsentierten Studie konnten entsprechende Daten von sechs Patienten gewonnen werden, welche im Mittel zum Zeitpunkt der Visit II eine tendenzielle Verringerung der eNOS-Expression um  $-5,0 (\pm 48,61) \%$  ergaben ( $p=0,81$ ). Zur Verringerung der Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Bestimmung von prozentualen Anteilen müsste jedoch die Auswertung eines deutlich größeren Kollektivs erfolgen. Eine valide Aussage bezüglich einer Veränderung lässt sich somit nicht stellen. Zudem bleibt die Frage zu erörtern, ob die nicht erzielte Absenkung des arteriellen Blutdrucks in dieser Studie einen Einfluss auf das Ergebnis gehabt haben könnte, oder ob die renale Denervation unabhängig vom Erfolg der Blutdrucksenkung positive oder negative Auswirkungen hat. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich dies nicht beantworten, sollte jedoch Bestandteil zukünftiger Forschung sein. Die vorliegende Studie stellt zum jetzigen Zeitpunkt vorrangig heraus, dass das experimentelle Design wichtige weiterführende Erkenntnisse erbringen könnte, welche in weiteren wissenschaftlichen Erhebungen berücksichtigt werden sollten.

### 4.3 Limitationen der Studie

Die Limitationen der Studie sind hauptsächlich in der geringen Anzahl eingeschlossener Patienten begründet. Eine statistische Signifikanz konnte so in den meisten zu untersuchenden Parametern nicht erzielt werden, sodass die Fragestellungen Teil weiterer wissenschaftlicher Forschung bleiben sollten. Auch eine längere Nachverfolgungszeit sollte angestrebt werden, um langfristige Effekte und möglicherweise deutlichere Entwicklungen über die Zeit zu erfassen. Zu beachten ist außerdem, dass in der Konstellation dieser Studie die primäre Intention der renalen Denervation, im Sinne einer Reduktion des arteriellen Blutdrucks, nicht erzielt wurde. Obwohl die Patienten vor Einschluss in die Studie keine kurzfristigen Änderungen des medikamentösen Therapieregimes erfuhren, kam es im Verlauf der Studie zu häufigen hausärztlich durchgeführten Anpassungen der Medikation. Auch eine Überprüfung der Adhärenz der Patienten mittels objektiver Maßnahmen war im Rahmen dieser Studie nicht vorgesehen. Weitere Limitationen ergeben sich durch die fehlende Kontrollgruppe, weshalb ein Hawthorne Effekt, ein Placeboeffekt sowie das Phänomen der Regression zur Mitte nicht ausgeschlossen werden können. Da das Hauptaugenmerk dieser Studie jedoch auf laborchemisch sowie experimentell erhobenen Parametern liegt, ist davon auszugehen, dass die angesprochenen Effekte einen geringeren Einfluss auf die Ergebnisse haben als bei klinisch erhobenen Größen. Durch die Erhebung einer ambulanten Langzeitblutdruckmessung über 24 Stunden, war es zudem möglich die Untersucher-Bias, Messfehler und den Weißkitteleffekt zu minimieren, sowie eine höhere Reproduzierbarkeit zu erzielen. Die Stärke der Studie liegt vordergründig darin, dass weitere Aspekte der renalen Denervation bezüglich des kardio-reno-vaskulären Risikos beleuchtet werden, Möglichkeiten zu dessen Beurteilung aufgezeigt werden, und somit ein zusätzlicher Beitrag in der Diskussion zur Beurteilung der Effektivität der renalen Denervation geleistet wird.

## 5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Effektivität der renalen Denervation bezüglich der arteriellen Blutdrucksenkung konnte bereits in vorherigen Studien demonstriert werden. Da die Intervention an der sympathischen Überaktivität, einem entscheidenden Punkt der Kreislaufregulation, ansetzt, sind weitere positive kardio-reno-vaskuläre Effekte zu erwarten.

Zielsetzung: Mittels klinischer und experimenteller Methoden sollen Marker renovaskulärer Schädigung bei Patienten mit therapierefraktärer arterieller Hypertonie erfasst werden sowie deren Beeinflussung durch eine renale Denervation untersucht werden.

Material und Methoden: Ein Patientenkollektiv (n=12) mit nachgewiesener therapieresistenter Hypertonie wurde in die Studie nach gründlicher Prüfung der Eignung zur renalen Denervation eingeschlossen. Klinische Untersuchungen und Anamnese dienten der Einschätzung des Allgemeinzustandes der Patienten sowie der Ermittlung des allgemeinen kardiovaskulären Risikos. Zusätzlich wurde der arterielle Blutdruck in klinischen Einzelmessungen sowie in der 24-h-Langzeitmessung ermittelt. Laborchemische Parameter wurden aus Blut- und Urinproben zur Beurteilung der Nierenfunktion sowie einer glomerulären Schrankenstörung jeweils vor und sechs Monate nach renaler Denervation mit standardisierten Methoden erhoben. Zur Beurteilung des Gefäßstatus sowie des endogenen Regenerationspotentials erfolgte die Untersuchung endothelialer Progenitorzellen (EPCs) auf deren Quantität, Proliferationsfähigkeit sowie Funktionalität.

Ergebnisse: Ein Patientenkollektiv von 12 Patienten mit nachgewiesener therapieresistenter Hypertonie konnte in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. In der ambulanten 24-h-Langzeitblutdruckmessung war ein Trend zum Anstieg des systolischen Blutdrucks um 8,58 ( $\pm$ 14,74) mmHg ( $p=0,07$ ) sowie des diastolischen Blutdrucks um 1,58 ( $\pm$ 7,56) mmHg ( $p=0,48$ ) verzeichnet worden. Die Anzahl antihypertensiver Medikamente hatte sich sechs Monate nach renaler Denervation im Mittel von 5,18 ( $\pm$ 0,75) auf 4,45 ( $\pm$ 0,82) reduziert ( $p=0,038$ ).

Die Nierenfunktion zeigte einen nicht signifikanten Trend zur Steigerung der eGFR um 5,15 ( $\pm$ 14,84) ml/min ( $p=0,25$ ). Ebenso wie sich bei der Untersuchung einer

Albuminurie eine nicht signifikante Tendenz zur Verringerung um  $-8,30 (\pm 71,28)$  mg/l ( $p=0,59$ ) zeigte, bei sonst nahezu unveränderter Gesamtmenge des Proteins im Urin.

Sechs Monate nach renaler Denervation konnte eine tendenzielle Zunahme von EPCs verzeichnet werden. Bei CD133/Flk-1-markierten Zellen um  $0,68 (\pm 1,28)$  % ( $p=0,25$ ;  $n=6$ ), bei CD133/cKit-markierten Zellen um  $0,9 (\pm 1,29)$  % ( $p=0,07$ ;  $n=6$ ). Die Proliferationsfähigkeit der EPCs zeigte sich unverändert. Die eNOS-Expression als Marker der Funktionalität der EPCs ergab keine Änderung ( $p=0,81$ ;  $n=6$ ).

Schlussfolgerung: Aufgrund der limitierten Anzahl an Studienteilnehmern konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Es ergaben sich jedoch einige Entwicklungen, welche als Ausgangspunkte für weitere wissenschaftliche Forschung dienen können. Zudem werden reno-vaskuläre Aspekte, welche möglicherweise in Zusammenhang mit der renalen Denervation stehen, beleuchtet und klinische sowie experimentelle Möglichkeiten zu deren Beurteilung aufgezeigt. Das Studiendesign eignet sich somit gut zur weitergehenden Forschung organoprotektiver Effekte der renalen Denervation.



## **6. Abgrenzung der vorliegenden Dissertation mit Präsentation der nephrologischen Endpunkte von der Dissertation Schulze-Brock mit kardiologischen Endpunkten**

Die Studie erfolgte in Kooperation der Kliniken für Nephrologie und Rheumatologie sowie Kardiologie und Pneumologie. Während die nephrologischen Endpunkte Teil dieser Arbeit sind, werden die kardiologischen Endpunkte in der Dissertationsarbeit von Paul Schulze-Brock dargestellt.

An dieser Stelle sollen gemeinsam und getrennt erhobene Parameter detailliert dargestellt werden.

### **6.1 Gemeinsam erhobene Parameter**

Die klinische körperliche Untersuchung und Anamnese der Patienten sowie die Messungen des arteriellen Blutdrucks, sowohl der klinischen Einzelmessung als auch der 24-Stunden-Langzeitmessung, wurden gemeinsam erhoben und ausgewertet. Auch die Standardlaborparameter wie Quick, pTT, kleines Blutbild, GOT, GPT, AP,  $\gamma$ GT, CRP, Na, K, Calcium gesamt und Kreatinkinase wurden im Rahmen der allgemeinen Untersuchung bestimmt.

Die sorgfältige Untersuchung der Patienten auf deren Eignung zur renalen Denervation durch Ausschluss einer sekundären Hypertonie, unter anderem durch Bestimmung des Renin-Aldosteron-Quotienten, Schlafapnoe-Screening sowie Doppler-Untersuchung der Nierenarterien, fand ebenfalls in Kooperation beider Kliniken statt.

### **6.2 Nephrologische Parameter**

Spezielle nephrologische Parameter beinhalten die Einschätzung der Nierenfunktion mittels eGFR, Kreatinin, Cystatin C sowie die Analytik des Urins auf die Proteine Albumin, Immunglobulin G, alpha-1-Mikroglobulin sowie Natrium und Kreatinin.

Die experimentellen Methoden zur Beurteilung des reno-vaskulären Risikos und endogenen Regenerationspotentials erfolgten im Rahmen der hier präsentierten Dissertation in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie. Hierzu zählen die Isolation der PBMCs und die Untersuchung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen bezüglich Quantität, Proliferationspotential und Funktionalität mittels FACS-Analyse, Zellkultur und Laserscanning-Zytometrie.

### **6.3 Kardiologische Parameter**

In die Dissertationsarbeit von Paul Schulze-Brock gingen die kardio-vaskulären Parameter ein, insbesondere die Laborparameter BNP, TNF- $\alpha$ , IL-6, Aldosteron, Renin und Leptin. Außerdem erfolgte die Auswertung des 6-Minuten-Gehtests, der echokardiographischen und elektrokardiographischen Untersuchungen sowie der Fragebögen zum subjektiven Gesundheits- und Wohlbefinden der Patienten zum Zeitpunkt der Baseline und im Vergleich zur Kontrollvisite nach 6 $\pm$ 1 Monaten.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9, 1370–1376
- Alper J, Arnold B, Calhoun D (1999): Contemporary management of refractory hypertension. *Curr Hypertens Rep* 1, 402–407
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999): Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* 85, 221–228
- Azizi M, Steichen O, Frank M, Bobrie G, Plouin P-F, Sapoval M (2012): Catheter-based Radiofrequency Renal-nerve Ablation in Patients with Resistant Hypertension. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 43, 293–299
- Bakris GL, Nadim MK, Haller H, Lovett EG, Schafer JE, Bisognano JD (2012): Baroreflex Activation Therapy provides durable benefit in patients with resistant hypertension: results of long-term follow-up in the Rheos Pivotal Trial. *J Am Soc Hypertens* 6, 152–158
- Bhatt DL, Kandzari DE, O'Neill WW, D'Agostino R, Flack JM, Katzen BT, Leon MB, Liu M, Mauri L, Negoita M, et al. (2014): A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N Engl J Med* 370, 1393–1401
- Böhm M. <http://dgk.org/pressemitteilungen/2014-jahrestagung/2014-ft-aktuelle-pm/2014-ft-statements/state-tag2/dgk-stellungnahme-zur-symplicity-htn-3-studie-zur-blutdrucksenkung-nach-renaler-denervation/>; Zugriff am 02.03.2017
- Cai H, Harrison DG (2000): Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* 87, 840–844
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ (2003): Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42, 1206–1252
- Cravedi P, Remuzzi G (2013): Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol* 76, 516–523
- Cuspidi C, Macca G, Sampieri L, Michev I, Salerno M, Fusi V, Severgnini B, Meani S, Magrini F, Zanchetti A (2001): High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension. *J Hypertens* 19, 2063–2070
- De Groot K, Hermann Bahlmann F, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, Fliser D (2004): Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 66, 641–646

- 
- de la Sierra A, Segura J, Banegas JR, Gorostidi M, de la Cruz JJ, Armario P, Oliveras A, Ruilope LM (2011): Clinical Features of 8295 Patients With Resistant Hypertension Classified on the Basis of Ambulatory Blood Pressure Monitoring. *Hypertension* 57, 898–902
- Esler MD, Krum H, Schlaich M, Schmieder RE, Böhm M, Sobotka PA (2012): Renal Sympathetic Denervation for Treatment of Drug-Resistant Hypertension Clinical Perspective. *Circulation* 126, 2976–2982
- Ewen S, Ukena C, Böhm M, Mahfoud F (2013): Percutaneous renal denervation: new treatment option for resistant hypertension and more? *Heart* 99, 1129–1134
- Fadl Elmula FEM, Larstorp AC, Kjeldsen SE, Persu A, Jin Y, Staessen JA (2015): Renal sympathetic denervation after Symplicity HTN-3 and therapeutic drug monitoring in severe hypertension. *Front Physiol* 6
- Fagard RH (2012): Resistant hypertension. *Heart* 98, 254–261
- Fan L, Levey AS, Gudnason V, Eiriksdottir G, Andresdottir MB, Gudmundsdottir H, Indridason OS, Palsson R, Mitchell G, Inker LA (2015): Comparing GFR Estimating Equations Using Cystatin C and Creatinine in Elderly Individuals. *J Am Soc Nephrol* 26, 1982–1989
- Gao L, Li P, Zhang J, Hagiwara M, Shen B, Bledsoe G, Chang E, Chao L, Chao J (2014): Novel Role of Kallistatin in Vascular Repair by Promoting Mobility, Viability, and Function of Endothelial Progenitor Cells. *J Am Heart Assoc* 3, e001194
- Grassi G (2009): Assessment of Sympathetic Cardiovascular Drive in Human Hypertension Achievements and Perspectives. *Hypertension* 54, 690–697
- Hering D, Marusic P, Duval J, Sata Y, Esler M, Walton A, Schlaich M (2016): OS 19-01 Blood Pressure independent Effects of Renal Denervation on the Decline of Kidney Function in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Hypertens* 34 Suppl 1-ISH 2016 Abstract Book, e228
- Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, Simard T, Rayner K, Sun J, Chen Y-X, Filion L, O'Brien ER (2011): Pre-Procedural Atorvastatin Mobilizes Endothelial Progenitor Cells: Clues to the Salutary Effects of Statins on Healing of Stented Human Arteries. *PLoS ONE* 6
- Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003): Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* 348, 593–600
- Hoffschulte B: Regenerationspotenzial CD133+-hämatopoetischer Progenitorzellen der humanen Nabelschnur beim Nierendefekt im Mausmodell. Medizinische Dissertation Universität Göttingen 2009
- Investigators SH-1 (2011): Catheter-Based Renal Sympathetic Denervation for Resistant Hypertension. *Hypertension* 57, 911–917

- 
- Kandzari DE, Bhatt DL, Brar S, Devireddy CM, Esler M, Fahy M, Flack JM, Katzen BT, Lea J, Lee DP, et al. (2015): Predictors of blood pressure response in the SYMPLICITY HTN-3 trial. *Eur Heart J* 36, 219–227
- Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Verter J (1984): The prognostic significance of proteinuria: The Framingham study. 1984 108, 1347–1352
- Kawasaki T, Itoh K, Uezono K, Sasaki H (1993): A simple method for estimating 24 h urinary sodium and potassium excretion from second morning voiding urine specimen in adults. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20, 7–14
- Kiuchi MG, Graciano ML, Carreira MAM de Q, Kiuchi T, Chen S, Lugon JR (2016): Long-Term Effects of Renal Sympathetic Denervation on Hypertensive Patients With Mild to Moderate Chronic Kidney Disease. *J Clin Hypertens* 18, 190–196
- Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, Stamler J (1996): Blood Pressure and End-Stage Renal Disease in Men. *N Engl J Med* 334, 13–18
- Kopp UC: Neural Control of Renal Function. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease; Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA) 2011
- Kopp UC (2015): Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 308, R79–R95
- Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, Sobotka PA, Sadowski J, Bartus K, Kapelak B, Walton A, Sievert H, Thambar S, et al. (2009): Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *The Lancet* 373, 1275–1281
- Lemarié CA, Shbat L, Marchesi C, Angulo OJ, Deschênes M-E, Blostein MD, Paradis P, Schiffrin EL (2011): Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 300, H745–H753
- Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V (2011): Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease. *J Appl Physiol* 111, 321–328
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G, National Kidney Foundation (2003): National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med* 139, 137-147
- Liang S, Le W, Liang D, Chen H, Xu F, Chen H, Liu Z, Zeng C (2016): Clinico-pathological characteristics and outcomes of patients with biopsy-proven hypertensive nephrosclerosis: a retrospective cohort study. *BMC Nephrol* 17

- 
- Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T (2001): HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108, 399–405
- Lobo MD, de Belder MA, Cleveland T, Collier D, Dasgupta I, Deanfield J, Kapil V, Knight C, Matson M, Moss J, et al. (2015): Joint UK societies' 2014 consensus statement on renal denervation for resistant hypertension. *Heart* 101, 10–16
- Lüscher TF, Mahfoud F (2014): Renal nerve ablation after SYMPLICITY HTN-3: confused at the higher level? *Eur Heart J* 35, 1706–1711
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, et al. (2013): 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 34, 2159–2219
- Marín R, Gorostidi M, Fernández-Vega F, Álvarez-Navascués R (2005): Systemic and glomerular hypertension and progression of chronic renal disease: The dilemma of nephrosclerosis. *Kidney Int* 68, S52–S56
- Ng FL, Saxena M, Mahfoud F, Pathak A, Lobo MD (2016): Device-based Therapy for Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 18
- Ott C, Mahfoud F, Schmid A, Ditting T, Sobotka PA, Veelken R, Spies A, Ukena C, Laufs U, Uder M, et al. (2013): Renal Denervation in Moderate Treatment-Resistant Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62, 1880–1886
- Ott C, Mahfoud F, Schmid A, Toennes SW, Ewen S, Ditting T, Veelken R, Ukena C, Uder M, Böhm M, Schmieder RE (2015): Renal denervation preserves renal function in patients with chronic kidney disease and resistant hypertension: *J Hypertens* 33, 1261–1266
- Page IH, Heuer GJ (1935): A Surgical Treatment of Essential Hypertension. *J Clin Invest* 14, 22–26
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA (1993): Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87, 1468–1474
- Parati G, Esler M (2012): The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* 33, 1058–1066
- Patschan D, Patschan S, Henze E, Wessels JT, Koziolok M, Müller GA (2009): LDL lipid apheresis rapidly increases peripheral endothelial progenitor cell competence. *J Clin Apheresis* 24, 180–185
- Peng F, Wu D, Ingram AJ, Zhang B, Gao B, Krepinsky JC (2007): RhoA Activation in Mesangial Cells by Mechanical Strain Depends on Caveolae and Caveolin-1 Interaction. *J Am Soc Nephrol* 18, 189–198

- 
- Persell SD (2011): Prevalence of Resistant Hypertension in the United States, 2003-2008. *Hypertension* 57, 1076–1080
- Persu A, Jin Y, Azizi M, Baelen M, Völz S, Elvan A, Severino F, Rosa J, Adiyaman A, Fadl Elmula FE, et al. (2014): Blood pressure changes after renal denervation at 10 European expert centers. *J Hum Hypertens* 28, 150–156
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G (2001): Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. *Circulation* 104, 191–196
- Riser BL, Cortes P, Zhao X, Bernstein J, Dumler F, Narins RG (1992): Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J Clin Invest* 90, 1932–1943
- RKI (2012): Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2012". Robert Koch-Institut, Berlin 2012  
[http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/Bluthochdruck.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/Bluthochdruck.pdf?__blob=publicationFile)  
Zugriff am 25.03.2015
- Ruilope LM (2002): The Kidney as a Sensor of Cardiovascular Risk in Essential Hypertension. *J Am Soc Nephrol* 13, S165–S168
- Ruilope LM, Bakris GL (2011): Renal function and target organ damage in hypertension. *Eur Heart J* 32, 1599–1604
- Schlaich MP, Schmieder RE, Bakris G, Blankestijn PJ, Böhm M, Campese VM, Francis DP, Grassi G, Hering D, Katholi R, et al. (2013): International Expert Consensus Statement: Percutaneous Transluminal Renal Denervation for the Treatment of Resistant Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62, 2031–2045
- Schmidt-Lucke C (2005): Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events: Proof of Concept for the Clinical Importance of Endogenous Vascular Repair. *Circulation* 111, 2981–2987
- Schmieder R, Schrader J, Zidek W, Tebbe U, Bramlage P, Paar W, Böhm M (2006): Subklinische Albuminurie, Mikroalbuminurie und Proteinurie - akzeptierte kardiovaskuläre Risikomarker? *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 131, 2665–2671
- Schmieder RE (2010): End Organ Damage In Hypertension. *Dtsch Ärztebl Int* 107, 866–873
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001): Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 103, 2776–2779

- 
- Simplicity HTN-2 Investigators, Esler M, Krum H, Sobotka P, Schlaich M, Schmieder R, et al. (2010): Renal sympathetic denervation in patients with treatment resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *The Lancet* 376, 1903–1909
- Sousa H, Branco P, de Sousa Almeida M, de Araújo Gonçalves P, Gaspar A, Dores H, Mesquita J, Andrade MJ, Neuparth N, Aleixo A, et al. (2017): Changes in albumin-to-creatinine ratio at 12-month follow-up in patients undergoing renal denervation. *Rev Port Cardiol* 36, 343–351
- Sudano I, Wolfrum M, Noll G, Lüscher TF. [http://kardiologie-gefaessmedizin.universimed.com/artikel/die-renale-sympathikusdenervation-eine-neue-t%C3%BCre-zur-heilung-der; Zugriff am 09.01.2017](http://kardiologie-gefaessmedizin.universimed.com/artikel/die-renale-sympathikusdenervation-eine-neue-t%C3%BCre-zur-heilung-der;Zugriff%20am%2009.01.2017)
- Sumida K, Hoshino J, Ueno T, Mise K, Hayami N, Suwabe T, Kawada M, Imafuku A, Hiramatsu R, Hasegawa E, et al. (2016): Effect of Proteinuria and Glomerular Filtration Rate on Renal Outcome in Patients with Biopsy-Proven Benign Nephrosclerosis. *PLoS ONE* 11, 2
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (1998): Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation by Restoring Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension. *Circulation* 97, 2222–2229
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434–438
- Tepper O M, Galiano R D, Capla J M, Kalka C, Gagne P J, Jacobowitz G R, Levine J, Gurtner G C (2002): Human Endothelial Progenitor Cells From Type II Diabetics Exhibit Impaired Proliferation, Adhesion, and Incorporation Into Vascular Structures. *Circulation* 106, 2781–2786
- Tousoulis D, Kampoli A-M, Tentolouris Nikolaos Papageorgiou C, Stefanadis C (2012): The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol* 10, 4–18
- Urbich C, Dimmeler S (2004): Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 95, 343–353
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001): Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circ Res* 89, e1–e7
- Vonend O, Böhm M, Eckert S, Hausberg M, Rittger H, Rump L-C, Schmieder R, Schulte K-L, Schunkert H, Uder M, et al. (2015): Renal denervation in refractory hypertension: Joint Statement of the German Hypertension League DHL eV and the German Societies of Cardiology, Angiology, Nephrology and Radiology. *ResearchGate* 140, 363



- 
- Wallbach M, Lehnig L-Y, Schroer C, Hasenfuss G, Müller GA, Wachter R, Koziolk MJ (2014): Impact of Baroreflex Activation Therapy on Renal Function - A Pilot Study. *Am J Nephrol* 40, 371–380
- Weigand S: Neue Biomarker zur Überwachung der zellulären Immunität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Medizinische Dissertation Universität Göttingen (2013)
- Weitzman D, Chodick G, Shalev V, Grossman C, Grossman E (2014): Prevalence and Factors Associated With Resistant Hypertension in a Large Health Maintenance Organization in Israel. *Hypertension* 64, 501–507
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G (2005): Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med* 353, 999–1007
- WHO (2013): A global brief on hypertension.  
[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/global\\_brief\\_hypertension/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/); Zugriff am 25.03.2015

## **Danksagung**

Meinen ganz herzlichen Dank möchte ich Herrn Professor Michael Koziolk aussprechen. Er ermöglichte mir im Rahmen dieser Dissertation die Mitarbeit in einem guten und auf gegenseitige Unterstützung bauenden Team sowie das Erlernen wissenschaftlicher Methoden im Rahmen eines faszinierenden Studiendesigns. Insbesondere danke ich für die über die gesamte Zeit andauernde unermüdliche und konstruktive Unterstützung, welche in besonderem Maße freundlich, wohlwollend und aufbauend war.

Weiterhin danke ich vielfach Herrn Privatdozenten Manuel Wallbach für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit. Stets schätzte ich den unerschöpflichen Zuspruch, den unerschütterlichen Glauben an das Gelingen, die stete Motivation und die positive und unermüdliche Unterstützung. Für diese mir hier geschenkte Erfahrung, welche über den gemeinsam durchgestandenen Rück- und Niederschlägen steht, bin ich äußerst dankbar.

Herrn Dr. Luca-Yves Lehnig möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank aussprechen für das geduldige Anlernen in den experimentellen Methoden sowie für die hier ebenfalls erfahrene kollegiale Unterstützung und den wertvollen persönlichen Kontakt.